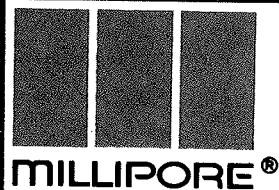


Volume 10 Número 1 Jan-Mar. 1979

Revista de Microbiologia

Publicação da Sociedade Brasileira de Microbiologia
São Paulo — Brasil

COMO RECER PARA NAO DESMESTER



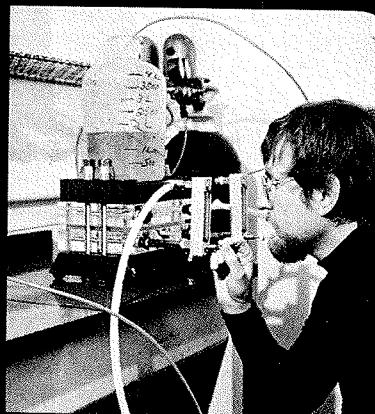
SE VOCÊ TEM PROBLEMAS COM:

- Rejeição por partículas
- Pirogênio - remoção e análise
- Esterilização e clarificação
- Água para injetáveis
- Análises bacteriológicas
- Ensaio de esterilidade
- Água ultrapura para laboratórios
(Excedendo padrões ASTM, USP, CAP)
- Concentração, separação e diálise
de macromoléculas

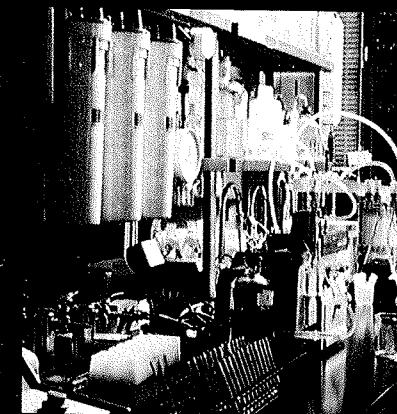
NÓS TEMOS A SOLUÇÃO,
APLICANDO NOSSA TECNOLOGIA,
ATRAVÉS DE TÉCNICOS DE NÍVEL
SUPERIOR, ESPECIALMENTE
TREINADOS.



Sistema de filtração
em produção farmacêutica



Sistema Cassete de ultrafiltração



Sistema Milli-Q para purificação
de água



Sistema para análise bacteriológica
e de esterilidade

Millipore Ind. e Com. Ltda. - Subsidiária da Millipore Corporation
Rua Guilherme Bannitz, 147 - CEP 04532 - São Paulo - Cx. Postal 19065
Tel. 531-4439 - Telex 1125078 Mily BR.



Revista de Microbiologia

**Publicação da Sociedade Brasileira de Microbiologia
São Paulo — Brasil**

Conselho Diretor Luiz Rachid Trabulsi, Italo Suassuna e Wilson Chagas de Araujo

Diretor Executivo João Salvador Furtado
Instituto de Botânica
Caixa Postal 4005
01000 São Paulo SP

Diretores Associados Flávio Alterthum
Instituto de Química — USP
Caixa Postal 20780
01000 São Paulo SP

Sérgio Olavo P. da Costa
Instituto de Química — USP
Caixa Postal 20780
01000 São Paulo SP

Assistente de Diretoria Leila Vasconcellos
Sociedade Brasileira de Microbiologia
Caixa Postal 4005
01000 São Paulo SP

Aquisição por não-membros Assinatura anual para quatro números: Cr\$ 400,00 para o Brasil; US\$ 25,00 (via marítima) ou US\$ 30,00 (via aérea) para o Exterior. Números avulsos: Cr\$ 100,00 para o Brasil e US\$ 7,00 (via aérea) ou US\$ 6,00 (via marítima) para o Exterior. Cheques em nome da Sociedade Brasileira de Microbiologia, para o endereço do Diretor Executivo da Revista de Microbiologia.

Acquisition by non-members Annual subscription for four numbers: US\$ 25.00 (surface mail) or US\$ 30.00 (air mail). Single copies: US\$ 7.00 (air mail) or US\$ 6.00 (surface mail). Checks for Sociedade Brasileira de Microbiologia, addressed to the Director's office.

Sociedade Brasileira de Microbiologia

Diretoria	Presidente Wilson Chagas de Araujo Instituto de Microbiologia UFRJ Centro de Ciências Médicas Ilha do Fundão 20000 Rio de Janeiro RJ	Secretário Geral Nelson Jeronymo Lourenço Faculdade de Ciências Médicas UERJ Departamento de Micro e Imunologia R. Teodoro da Silva, 48 20000 Rio de Janeiro RJ
	Vice-Presidente João Salvador Furtado Instituto de Botânica Caixa Postal 4005 01000 São Paulo SP	Tesoureiro Milton Mangini 01000 São Paulo SP

Objetivos A Sociedade Brasileira de Microbiologia, fundada em 28 de setembro de 1956, é sociedade civil, sem fins lucrativos, dedicada a agremiar microbiologistas brasileiros; a promover o desenvolvimento da microbiologia através do estímulo à pesquisa científica e suas aplicações, melhorar as qualificações profissionais dos microbiologistas; e manter intercâmbio e fazer aproximação com entidades que visem objetivos semelhantes. Organiza, anualmente, na última semana do mês de julho, o Congresso Brasileiro de Microbiologia e edita a Revista de Microbiologia, com distribuição trimestral. Para informações sobre a SBM, escrever para qualquer membro da Diretoria.

Instruções aos autores

A Revista de Microbiologia publica trabalhos originais em todos os campos da microbiologia e da protozoologia. Revisões e atualizações serão publicadas a convite do conselho diretor.

Os manuscritos devem ser enviados em duplicata (original e uma cópia) para o Diretor Executivo da Revista.

NORMAS GERAIS — Todo manuscrito submetido à Revista deve representar pesquisa original inédita e que não será publicada em outro órgão. Os trabalhos podem ser redigidos em português, espanhol ou inglês. Se aceitos pela Revista, não poderão ser reproduzidos, mesmo em partes, sem permissão oficial dos Diretores da Revista.

A Revista segue, essencialmente, o "Style Manual for Biological Journals" (2^a edição, AIBS, 1964). Os símbolos genéticos devem seguir, essencialmente, as recomendações de Demerec & col. (Genetics, 54:61, 1966). Abreviações bioquímicas devem seguir, essencialmente, as regras da IUPAC-IUB (J. Biol. Chem., 241:527, 1966). Atividade enzimática deve ser expressa em termos de unidades internacionais (Enzyme Nomenclature, Elsevier Publ. Co., 1965). Para pesos e volumes, devem ser usados os prefixos nano (n) e pico (p), ao invés de milímicro ($\mu\mu$) e micromico ($\mu\mu$). Comprimentos devem ser expressos em micrômetro (μm ; 10^{-6}m), ao invés de micro (μ); nanômetro (nm ; 10^{-9}m), ao invés de milímicro (μm); e Angstroms (A ; 10^{-10}m). Partes por milhão (ppm) devem ser expressas como microrganismos por milímetros ($\mu\text{g}/\text{ml}$) ou microlitros por litro ($\mu\text{litros/litro}$). A Revista se reserva o direito de adaptar os manuscritos ao estilo adotado.

NOMENCLATURA DE MICRORGANISMOS — A combinação binomial, nome do gênero seguido do da espécie, é adotada e a nomenclatura apresentada no "Bergey's Manual of Determinative Bacteriology" (7^a ed., 1957) obedecida. Se o Autor divergir dessa nomenclatura, seu julgamento será respeitado, mas a classificação correspondente ao Manual de Bergey deverá ser mencionada a seguir, entre parênteses, à primeira vez em que o nome figurar no texto e no resumo.

Quando um nome novo for proposto para um microrganismo, será solicitada opinião de uma autoridade internacional em taxonomia.

FORMA DO MANUSCRITO — Os trabalhos devem ser datilografados em papel branco, comum, tamanho ofício, em espaço duplo ou triplo, deixando-se o mínimo de 3 cm de margens laterais, superior e inferior. Títulos de capítulos de primeira ordem devem ser centrados, incluídos essencialmente pela ordem: **Introdução, Material e Métodos, Resultados, Discussão, Agradecimentos, Referências Bibliográficas**. Os de subcapítulos devem ser junto à margem esquerda.

A *página-título* deverá conter apenas e tão somente: (i) o título do artigo, centrado usando-se letras maiúsculas somente quando obrigatórias, (ii) o(s) nome(s) do(s) autor(es) com maiúsculas e minúsculas normalmente usadas e (iii) afiliação como nota de rodapé, indicada por asterisco.

O *resumo* não deverá ultrapassar 250 palavras. Os trabalhos redigidos em inglês devem ser acompanhados de um título e resumo em português; os redigidos em português e espanhol, de um título e resumo em inglês. O resumo na língua do trabalho e o título com resumo na outra língua devem ser datilografados em página separada do restante do texto.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS — No texto, as referências devem ser citadas por número. Os sobrenomes, de dois autores devem ser separados por &; quando houver mais de dois autores, a separação é feita por ponto e vírgula e o último por &. Na secção **Referências Bibliográficas**, as citações devem ser por ordem alfabética de autor (ou da mesma combinação de autores) e, para um mesmo autor, em ordem cronológica, numeradas sequencialmente. Os artigos em periódicos devem ser citados na seguinte ordem: nome(s) do(s) autor(es) em maiúsculas e minúsculas, título do trabalho, nome do periódico (abreviado de acordo com o World Medical Periodicals), número do volume, número do fascículo (quando desejado; colocado entre parênteses), número da primeira e da última página do artigo, e ano da publicação.

Exemplo:

Weiser, O. L. & Emerson, J. S. — Selective screening for quantitative urine cultures.
Amer. J. clin. Path., 45:649-650, 1966.

Quando puder ocorrer confusão com o título do periódico, o local da publicação deverá ser mencionado entre parênteses, após a abreviação. Exemplo: Publ. Hlth Rep. (Wash.).

Citações de livros devem ter a seguinte ordem: autor(es), título, edição, local, editores e data. Exemplo:
Miller, S. E. — A textbook of clinical pathology. 6th ed. Baltimore, Williams & Wilkins, 1960.

Citações de "resumos", "dados não publicados", "comunicações pessoais" ou "no prelo" poderão ser adequadamente mencionadas no texto, mas não serão aceitas como referências bibliográficas.

TABELAS — Devem ser numeradas em árabe e datilografadas em páginas separadas. Os dados devem ser arranjados de maneira que colunas de material idêntico sejam lidas perpendicular e não transversalmente. Cabeçalhos e legendas devem ser suficientemente claros e compreensíveis, sem necessidade de consulta ao texto. São permitidas notas explanativas de rodapé indicadas por asteriscos, mas não descrições pormenorizadas dos experimentos. Materiais e métodos utilizados para a obtenção dos resultados devem ser incluídos na secção correspondente.

ILUSTRAÇÕES — Cada uma das duas vias do manuscrito deverá ser acompanhada de um conjunto completo de ilustrações (preferivelmente como fotografias). Os gráficos e desenhos devem ser concluídos, não requerendo qualquer montagem ou rearranjo. Nenhuma parte do gráfico deverá ser datilografada, devendo ser usado um e o mesmo normógrafo. As fotografias de ilustrações a traço devem ser feitas em papel de alto contraste apropriado. É recomendável submeter gráficos e desenhos no dobro da impressão final da Revista, prevendo-se todos os elementos da figura para as escalas de redução. Fotografias com retículas devem ser feitas em papel brilhante, com contrastes adequado para a reprodução na escala 1:1, observados os espaços máximos disponíveis na Revista e seus submúltiplos, reservando-se espaço suficiente para a legenda. Sempre que houver escala de aumento ou redução, esta deverá ser superposta ou desenhada diretamente na fotografia ou figura. Ver instruções sobre legendas, notas de rodapé, etc. sob TABELAS. Proteja as ilustrações durante o trânsito, com uma folha de papelão.

NOTAS BREVES — Não devem exceder a 500 palavras e o respectivo resumo não mais do que 25. O(s) autor(es) deve(m) consultar um número da Revista para familiarização com a forma e o estilo.

SEPARATAS — Serão fornecidas, gratuitamente 50 separatas por artigo. Para encomendas maiores, o(s) autor(es) deve(m) entrar em entendimento com o Diretor Executivo, correndo as despesas por conta dos interessados.

Revista de Microbiologia

Publicação da Sociedade Brasileira de Microbiologia

Volume 10 Janeiro-Março 1979 Número 1

Rev. Microbiol. (S. Paulo), 10 (1)

CONTEÚDO

- | | | |
|---|----|--|
| Laurinda A. Soares
& Luiz R. Trabulsi | 1 | Atividade antibacteriana "in vitro" de Gentamicina, Tobramicina e Sisomicina |
| Edison P.T. de Oliveira
Hisako Gondo Higashi
& Hideyo Izuka | 6 | Algumas modificações na técnica de titulação das toxinas e anatoxinas tetânicas "in vitro" |
| Eliana P. de Carvalho
& Luiz C.G. Costa | 10 | Diferentes temperaturas e meios de cultura para o isolamento de <i>Salmonella</i> sp. e outras bactérias, em rações iniciais para frangos de corte |
| Mário T. Shimizu
& Flávio Alterthum | 14 | Estudo comparativo entre o conteúdo de esteróis e resistência a polienos em diferentes espécies de leveduras. |
| Jocelém M. Salgado
& José Renato Sarruge | 19 | Influência de compostos nitrogenados e da relação C/N na obtenção do concentrado protéico de microrganismos |
| Pedro M. Lacava | 22 | Comportamento "in vitro" do fungo <i>Aspergillus nidulans</i> em resposta ao fungicida Plantvax |
| Pedro M. Lacava | 26 | Resistência genética do <i>Aspergillus nidulans</i> ao fungicida Benomil |
| Allen N. Hagler
& L.C. Mendonça-Hagler | 30 | Tolerância ao cloreto de sódio em leveduras isoladas de água do mar poluída no Rio de Janeiro |
| Lusinete Aciole de Queiroz
& Adhemar Purchio | 34 | <i>Filobasidiella neoformans</i> obtido pelo cruzamento de amostras de <i>Cryptococcus neoformans</i> sorotipo D com AD |
| Allen N. Hagler
Selma S. Santos
& L.C. Mendonça-Hagler | 36 | Leveduras de um estuário brasileiro poluído |

CONTENTS

- | |
|---|
| "In vitro" antibacterial activity of gentamycin tobramycin and sisomicin |
| A few modifications in the titration technique "in vitro" of tetanus toxins and anatoxins |
| Different temperatures and culture media for isolation of <i>Salmonella</i> sp. and other microorganisms in broiler starter rations |
| Sterol amounts in cell membrane and resistance of yeasts to poliene antibiotics |
| Influence of nitrogen compounds and C/N ratio on proteic concentrate of microorganisms |
| Behavior "in vitro" of the fungus <i>Aspergillus nidulans</i> in response to the fungicide plantvax |
| Genetical resistance of <i>Aspergillus nidulans</i> to benomil |
| Sodium chloride tolerance of yeasts isolated from a polluted estuary in Rio de Janeiro |
| <i>Filobasidiella neoformans</i> obtained from strains of <i>Cryptococcus neoformans</i> D and AD serotypes |
| Yeasts of a polluted Brazilian Estuary |

Sociedade Brasileira de Microbiologia

Sócios Patrocinadores

Eli Lily do Brasil Ltda.

Indústria Química e Farmacêutica Schering S.A.

Coca-Cola Indústrias Ltda.

Atividade antibacteriana "in vitro" de Gentamicina, Tobramicina e Sisomicina

Laurinda A. Soares*
& Luiz R. Trabulsi**

Resumo

Foi determinada a concentração inibitória mínima de sisomicina, gentamicina e tobramicina, para 534 amostras de bactérias, isoladas recentemente de material clínico, incluindo *Pseudomonas*, enterobactérias e cocos Gram-positivos. Para um número (80) representativo dessas amostras, foi determinada também a concentração bactericida mínima dos três antibióticos. A atividade antibacteriana dos três antibióticos foi semelhante, mas a sisomicina se revelou mais ativa do que a gentamicina e a tobramicina, para a maioria das amostras estudadas.

Summary

"In vitro" antibacterial activity of gentamicin, tobramycin and sisomicin

The minimal inhibitory concentration (MIC) of sisomicin, gentamicin and tobramycin was determined for 534 bacterial strains, recently isolated from clinical material. These strains comprised *Pseudomonas*, *Enterobacteriaceae* and Gram-positive cocci. From a representative number of the strains the minimal bactericidal concentration (MBC) of the three drugs was determined. The antibacterial activity of the three antibiotics was similar, but sisomicin was more active for the majority of the strains tested.

Introdução

O crescente aparecimento de germes Gram-negativos, resistentes a vários antibióticos, tem criado sérios problemas de terapêutica. Dentre os antibióticos, mais ativos contra bactérias Gram-negativas, destacam-se os aminoglicosídeos, sendo a gentamicina o mais empregado atualmente. Entretanto, o uso intenso da canamicina primeiramente, e posteriormente da gentamicina, provocou o aparecimento de número relativamente grande de germes resistentes, o que tornou necessária a investigação da atividade de novos aminoglicosídeos, que poderiam ser usados no tratamento das infecções por essas bactérias.

A sisomicina e a tobramicina são novos aminoglicosídeos, cujo espectro de atividade se as-

semelha ao da gentamicina. Embora exista resistência cruzada entre as três drogas, o grau varia de acordo com a bactéria e o antibiótico (1, 13, 17).

O objetivo deste trabalho é a comparação da atividade antibacteriana, bacteriostática e bactericida da gentamicina, tobramicina e sisomicina contra amostras de bactérias recentemente isoladas de material clínico em nosso meio.

Material e Métodos

Amostras de bactérias — Foi verificada a susceptibilidade de 534 amostras dos seguintes germes: 98 amostras de *Escherichia coli*, 93 de *Proteus mirabilis*, 63 de *Klebsiella pneumoniae*, 38 de *Pseudomonas aeruginosa*, 41 de *Salmo-*

* Laboratório de Microbiologia da Bayer do Brasil S.A., Caixa Postal 959, 01000 São Paulo, SP.

** Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Escola Paulista de Medicina, Rua Botucatu, 862, 01000 São Paulo, SP.

nella sp., 37 de *Shigella* sp., 38 de *Enterobacter* sp., 46 de *Proteus* indol-positivo, 28 de *Citrobacter* sp., 7 de *Providencia* sp., 38 de *Staphylococcus aureus* e *S. epidermidis*, e 7 de enteroococo.

Todas as amostras foram isoladas de casos clínicos recentes, tais como infecções urinárias, intestinais, pulmonares, cutâneas, septicêmicas e outras. As amostras isoladas foram identificadas segundo Lennette's Manual of Clinical Microbiology (1975) e, em alguns casos, de acordo com o sistema API, para identificação de *Enterobacteriaceae*. Para as amostras de *Salmonella*, *Shigella* e *E. coli*, foi feita também a identificação sorológica. Entre 98 amostras de *E. coli*, 36 são enteropatogênicas.

Drogas — Foram utilizados sulfatos de sisomicina (Bayer), gentamicina (Schering) e tobramicina (Elli Lilly).

Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) — Foi empregado o método de diluição em placa, utilizando-se o replicador de Steers & col. (18). Os antibióticos foram usados diluídos em múltiplos de 2, de 0,06mcg/ml a 256mcg/ml. O meio de cultura usado foi o agar Mueller-Hinton (Difco) e o inóculo consistiu em aproximadamente 10^6 bactérias em fase logarítmica de crescimento. O critério adotado

para a leitura foi a mais baixa concentração de antibiótico necessária para inibir 90 a 100% do crescimento visível das células, após 18 horas de incubação a 37°C.

Determinação da concentração bactericida mínima (CBM) — Foi determinada a concentração bactericida mínima para um número (80) representativo das amostras (20 de *E. coli*, 10 de *P. mirabilis*, 10 de *Proteus* indol-positivo, 10 de *Klebsiella pneumoniae*, 10 de *Pseudomonas aeruginosa*, 10 de *Enterobacter*, 10 de *Citrobacter*), usando-se o método de diluições em tubo. O meio de cultura utilizado foi o caldo Mueller-Hinton (Difco), sendo o inóculo e o tempo de incubação os mesmos usados para a CIM em placa. A CBM foi verificada repicando-se para agar Mueller-Hinton isento de drogas o meio dos tubos em que não ocorreu crescimento.

Foram feitos controles de viabilidade das amostras e de esterilidade das diluições dos antibióticos.

Resultados

O espectro de atividade da gentamicina, tobramicina e sisomicina foi semelhante para as amostras estudadas, havendo contudo algumas diferenças dignas de nota. Na Tabela 1,

Tabela 1 — Faixa de variação das concentrações inibitórias e concentração inibitória mediana de gentamicina, sisomicina e tobramicina

Bactérias	Sisomicina	Gentamicina	Tobramicina
<i>E. coli</i>	0,5 (0,25-256)	1,0 (0,25>256)	1,0 (0,5-128)
<i>P. mirabilis</i>	0,5 (0,12-256)	1,0 (0,25-128)	1,0 (0,25-64)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0,5 (0,25-128)	1,0 (0,25-128)	2,0 (0,25-128)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	4,0 (0,12-256)	8,0 (0,25-256)	2,0 (0,12-256)
<i>Salmonella</i> sp.	0,5 (0,25-16)	1,0 (0,25-16)	2,0 (0,5-32)
<i>Shigella</i> sp.	1,0 (0,12-2,0)	1,0 (0,12-2,0)	2,0 (0,12-2,0)
<i>Enterobacter</i> sp.	0,5 (0,12-64)	1,0 (0,12-32)	1,0 (0,5-128)
<i>Proteus</i> indol positivo	0,5 (0,12-64)	0,5 (0,25-256)	1,0 (0,25-128)
<i>Citrobacter</i> sp.	0,5 (0,12-8,0)	0,5 (0,25-16)	1,0 (0,5-16)
<i>Providencia</i> sp.	0,25 (0,12-2,0)	0,5 (0,12-4,0)	0,5 (0,25-4,0)
<i>Staphylococcus</i> sp.	0,12 (0,06-256)	0,25 (0,06-256)	0,25 (0,06-256)
Enterococo	16 (0,12-128)	16 (0,25-32)	32 (0,25-128)

Tabela 2 — Faixa de variação das concentrações bactericidas e concentração bactericida mediana de sisomicina, gentamicina e tobramicina

Bactérias(80)	Sisomicina	Gentamicina	Tobramicina
<i>E. coli</i> (20)	2,0 (1,0-4,0)	4,0 (1,0-8,0)	4,0 (1,0-16)
<i>Proteus</i> sp. (20)	4,0 (2,0-8,0)	4,0 (4,0-16)	16 (4,0-32)
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (10)	0,5 (0,5-2,0)	1,0 (0,5-2,0)	1,0 (1,0-8,0)
<i>Enterobacter</i> sp. (10)	1,0 (0,5-1,0)	1,0 (1,0-2,0)	1,0 (1,0-2,0)
<i>Citrobacter</i> sp. (10)	0,5 (0,25-1,0)	1,0 (0,5-2,0)	1,0 (1,0-2,0)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (10)	1,0 (0,5-2,0)	2,0 (1,0-4,0)	1,0 (0,25-2,0)

Tabela 3 — Concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) de 80 amostras frente aos três aminoglicosídeos

Bactérias (80)	Sisomicina (*CIM = 0,25-4,0)				Gentamicina (CIM = 0,5-4)				Tobramicina (CIM = 0,25-4)			
	CBM igual CIM	CBM 2X CIM	CBM 4X CIM	CBM 8X CIM	CBM igual CIM	CBM 2X CIM	CBM 4X CIM	CBM 8X CIM	CBM igual CIM	CBM 2X CIM	CBM 4X CIM	CBM 8X CIM
<i>E. coli</i> (20)	**10	10	—	—	8	10	2	—	3	12	5	—
<i>Proteus</i> (20)	2	10	8	—	2	13	4	1	2	16	2	—
<i>Klebsiella</i> (10)	9	1	—	—	8	2	—	—	7	1	2	—
<i>Pseudomonas</i> (10)	2	5	3	—	1	2	5	2	4	2	4	—
<i>Citrobacter</i> (10)	2	8	—	—	4	6	—	—	8	2	—	—
<i>Enterobacter</i> (10)	5	5	—	—	3	4	3	—	6	3	1	—

* Limites superior e inferior da CIM de todas as amostras

** Número de amostras com CBM igual à CIM

encontra-se a faixa de variação das concentrações inibitórias e a concentração inibitória mediana das três drogas. A sisomicina foi mais ativa do que a gentamicina e a tobramicina para as amostras de *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella* sp., *Enterobacter* sp., *Providencia* sp. e *Staphylococcus* sp. Com relação às amostras de *Shigella* sp., *Proteus* indol-positivo e *Citrobacter* sp., a gentamicina e a sisomicina apresentaram a mesma atividade e foram mais ativas que a tobramicina. Entretanto, a tobramicina foi mais ativa que as outras duas drogas, para as amostras de *Pseudomonas aeruginosa*. Quanto às amostras de enterococo, a atividade dos três aminoglicosídeos foi bastante reduzida.

Na Tabela 2, encontra-se a faixa de variação das concentrações bactericidas e concentrações bactericidas medianas das três drogas em relação a 80 amostras. A concentração bacteri-

cida mediana da sisomicina foi regularmente mais baixa do que as da gentamicina e tobramicina para *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Citrobacter* sp.

Com relação às amostras de *Enterobacter* sp., a concentração bactericida mediana das três drogas foi idêntica; quanto às amostras de *Proteus*, a concentração bactericida da sisomicina foi igual à de gentamicina e, ambas, inferiores à de tobramicina; e em se tratando das amostras de *Pseudomonas*, a concentração bactericida da sisomicina e da tobramicina foram iguais e inferiores às de gentamicina. Considerando-se a faixa de variação das concentrações bactericidas, a sisomicina foi quase sempre mais ativa do que os outros dois antibióticos

Na Tabela 3, é apresentada uma comparação das CBMs e CIMs dos três antibióticos, para as 80 amostras mencionadas. De modo geral,

observa-se um paralelismo de comportamento dos três antibióticos, no sentido da homogeneidade dos resultados para cada grupo de amostras, embora possamos destacar, mais uma vez, maior atividade da sisomicina. Entretanto, se considerarmos os diferentes grupos de amostras de modo comparativo, verifica-se diversidade de comportamento. Por exemplo, as concentrações bactericidas dos três antibióticos foram frequentemente superiores às concentrações inibitórias, com relação às amostras de *Proteus* e *Pseudomonas*, o mesmo não acontecendo ou acontecendo em menor escala com as amostras de *E. coli*, *Citrobacter*, *Enterobacter* e *Klebsiella*.

Devemos ressaltar ainda que as CIMs obtidas com as amostras de *Pseudomonas aeruginosa*, usando-se o método de diluição em tubos, foram geralmente de 2 a 8 vezes mais baixas do que as obtidas pelo método de diluição em placa.

Discussão

Os resultados desse estudo mostram que a sisomicina foi mais ativa que a gentamicina e a tobramicina, para a maioria das amostras de bactérias estudadas. Houve concordância de resultados, quer se considere a concentração bacteriostática ou a concentração bactericida. As exceções encontradas dizem respeito à maior atividade bacteriostática da tobramicina, para *Pseudomonas aeruginosa*, e atividade bacteriostática idêntica da sisomicina e gentamicina, para as amostras de *Shigella*, *Proteus* indol-positivo e *Citrobacter*.

Considerando-se a CBM, a sisomicina deixou de ser mais ativa, em relação às amostras de *Enterobacter*, *Proteus* e *Pseudomonas*. Para *Enterobacter*, a CBM das três drogas foi idêntica; para *Proteus*, a CBM de sisomicina e gentamicina foi 4mcg e a de tobramicina foi 16mcg; e, para *Pseudomonas*, a CBM da sisomicina e tobramicina foi 1mcg e a de gentamicina foi 2mcg.

Em se tratando das amostras de enterococo as três drogas foram pouco ativas.

O encontro de diferenças de atividade dos antibióticos, pelo método de diluição em meios líquidos e sólidos, conforme verificado para *Pseudomonas aeruginosa*, já foi mencionado por outros autores (2, 21, 22).

Embora as diferenças encontradas "in vitro" sejam discretas, deve ser destacado que resul-

tados idênticos foram obtidos por diferentes autores (1, 3, 5, 6, 9, 11, 12). A comparação das CBMs com as CIMs também mostra maior atividade da sisomicina, sendo interessante realçar a variação de respostas apresentada pelos grupos de bactérias estudadas. Tais achados são compatíveis com a verificação de Weinstein (20) de que a sisomicina é incorporada pela célula bacteriana em maior quantidade do que a gentamicina.

Poucos dados existem, contudo, mostrando a atividade protetora "in vivo" dessas drogas (14, 15, 16, 19). Trabalhando com várias amostras de germes que possuíam a mesma CIM para sisomicina e gentamicina, Scheer (15) constatou que a dose protetora de sisomicina era menor, mostrando-se mais eficaz do que a gentamicina, de acordo com os seguintes fatores: contra *Serratia* 1,3; *Proteus* 1,9; *E. coli* 2,0; *Klebsiella* 2,4; *Staphylococcus* 2,5 e *Pseudomonas* 3,2. Tal diferença de comportamento entre ambas as drogas "in vitro" e "in vivo" não está correlacionada com a ligação proteica, visto que não foi encontrada nenhuma ligação mensurável de ambas as drogas no soro humano (10). Estudo semelhante foi realizado por Waits & col. (19, para verificar a ação protetora de sisomicina, gentamicina, tobramicina e canamicina. Observaram que as diferenças verificadas "in vitro" não correspondiam exatamente às constatadas "in vivo", sendo a sisomicina nitidamente a mais ativa das quatro drogas, seguida por gentamicina, tobramicina e canamicina. A diferença mais notável "in vitro", quanto à maior susceptibilidade de *Pseudomonas* frente à tobramicina, não foi observada "in vivo", sendo a sisomicina também a mais ativa contra esse germe. Young & Hewitt (22) verificaram que a atividade bactericida de sisomicina, gentamicina, tobramicina, amicacina e butirosina era demonstrável como função de tempo: em quatro horas, mais de 99,9% das culturas de várias bactérias haviam morrido, sendo a sisomicina a que agia com mais rapidez.

A maior atividade da sisomicina, tanto "in vitro" como "in vivo", pode ser explicada pela incorporação mais rápida da sisomicina e pela maior rapidez da atividade bactericida (22), e "in vivo" também pelos níveis séricos mais elevados (4, 7, 8).

O conjunto de resultados obtidos até agora sugere maior vantagem da sisomicina, com relação à gentamicina e tobramicina. Entretanto, é necessário maior número de observações, em particular estudos clínicos, para uma avaliação definitiva das três drogas.

Referências Bibliográficas

1. Crowe, C.C. & Sanders, E. — Sisomicin: evaluation in vitro and comparison with gentamicin and tobramycin. *Antim. Agents Chemoth.*, 3:24-28, 1973.
2. D'Amato, R.F.; Thornsberry, C.; Baker, C.N. & Kirven, L.A. — Effect of calcium and magnesium ions on the susceptibility of *Pseudomonas* species to tetracycline, gentamicin, polymyxin B and carbenicillin. *Antim. Agents Chemoth.*, 7:596-600, 1975.
3. Grimm, H. — Vergleichende Bestimmungen der minimalen Hemmkonzentrationen von Gentamicin, Tobramycin, Amikacin und Sisomicin in Isotonic Sensitest Broth. *Infection*, 4 (Suppl. 4):309-316, 1976.
4. Gruenwaldt, G.; Doenicke, A.; Scheer, M. & Fink, H. — Vergleichende Untersuchungen zur Pharmakokinetik von Sisomicin und Gentamicin. *Infection*, 4 (Suppl. 4):370-375, 1976.
5. Hyams, P.J.; Simberkoff, M.J. & Rahal, J.J. — In vitro bactericidal effectiveness of four aminoglycoside antibiotics. *Antim. Agents Chemoth.*, 3:87-94, 1973.
6. Levison, M.E. & Kaye, D. — In vitro comparison of four aminoglycoside antibiotics: sisomicin, gentamicin, tobramycin and BB-K8. *Antim. Agents Chemoth.*, 5:667-669, 1974.
7. Lode, H.; Kemmerich, B. & Koeppe, P. — Comparative clinical pharmacology of gentamicin, sisomicin and tobramycin. *Antim. Agents Chemoth.*, 8:396-401, 1975.
8. Lode, H.; Kemmerich, B.; Koeppe, P. & Langmaack, H. — Vergleichende Pharmakokinetik und klinische Erfahrungen mit einem neuen Aminoglykosid-Derivat: Sisomicin. *Deutsche Med. Wochenschr.*, 42:2144-2150, 1975.
9. Ritzerfled, W. — Untersuchungen zur antibakteriellen Aktivität von Sisomicin. In vitro und in vivo Ergebnisse. *Infection*, 4 (Suppl. 4):343-348, 1976.
10. Rosenkranz, H.; Scheer, M. & Scholtan, W. — Die Bindung von Sisomicin und Gentamicin an die Eiweißkörper des Serums. *Arzneim. Frosch.*, 26:1517-1521, 1976.
11. Rosin, H. & Naumann, P. — Comparative evaluation of five aminoglycosides. VI Internat. Congress, Warschau, 1974.
12. Schassan, H.H. — Die antimikrobielle Wirkksamkeit von Sisomicin. I — In-vitro-Aktivität von Sisomicin im Vergleich mit Gentamicin, Tobramycin, Amikacin und Kanamycin. *Infection*, 4:35-41, 1976.
13. Scheer, M. — Antibakterielle Wirkung von Sisomicin im Vergleich zu Gentamicin. *Arzneim. Forsch.*, 26:772-778, 1976.
14. Scheer, M. — In vivo activity of sisomicin in mice. *Cancer Chemotherapy*, 2:403-408, 1976.
15. Scheer, M. — Wirkungsvergleich von Sisomicin und Gentamicin im Tierexperiment. *Infection*, 4 (Suppl. 4):366-369, 1976.
16. Shadomy, S.; Utz, C. & Shadomy, H.J. — In vivo studies with sisomicin, gentamicin and tobramycin. *Infection*, 4 (Suppl. 4):362-365, 1976.
17. Soares, L.A. & Trabulsi, L.R. — Atividade "in vitro" da sisomicina contra amostras de *Pseudomonas aeruginosa*, enterobactérias e de outras espécies bacterianas resistentes e sensíveis à gentamicina. *Rev. Microb. (S. Paulo)*, 8:24-29, 1977.
18. Steers, V.L.; Foltz, E.L. & Graves, B.W. — An inocula replicating apparatus for routine testing of bacterial susceptibility to antibiotics. *Antibiot. Chemoth.*, 9:307-311, 1959.
19. Waitz, J.A.; Moss, E.L.; Drube, C.G. & Weinstein, M.J. — Comparative activity of sisomicin, gentamicin, kanamycin and tobramycin. *Antim. Agents Chemoth.*, 2:431-437, 1972.
20. Weinstein, M.J. — Microbiologia da sisomicina. Excerpta Médica Int. Symposia Series, Rio de Janeiro, Abstracts pg. 2, 1976.
21. Weinstein, R.J.; Young, L.S. & Hewitt, W.L. — Activity of three aminoglycosides and two penicillins against four species of Gram-negative bacilli. *Ant. Agent Chemoth.*, 7:172-178, 1975.
22. Young, L.S. & Hewitt, W.L. — Activity of five aminoglycoside antibiotics in vitro against Gram-negative bacilli and *Staphylococcus aureus*. *Antim. Agents Chemoth.*, 4:617-625, 1973.

Algumas modificações na técnica de titulação das toxinas e anatoxinas tetânicas "in vitro"*

Edison Paulo Tavares de Oliveira
Hisako Gondo Higashi
& Hideyo Iizuka

Resumo

Algumas modificações na técnica clássica de titulação de toxinas e anatoxinas tetânicas "in vitro", permitem abreviar o tempo de flocação (kf) da reação. Estas modificações, consistindo no acerto do pH e no resfriamento prévio da mistura antígeno-anticorpo tetânico, possibilitaram também a obtenção de uma única zona de flocação.

Summary

A few modifications in the titration technique "in vitro" of tetanus toxins and anatoxins
Modifications to the classical titration techniques of tetanus toxins and anatoxins "in vitro", enabling an abbreviation of the flocculation time (kf), by adjusting the pH as well previous cooling of the antigen-antibody mixture, resulted into a single flocculation zone.

Introdução

Nas titulações das toxinas e anatoxinas tetânicas pelo método clássico de Ramon & Descombey (12, 13), tem-se encontrado certas dificuldades técnicas, não só pelo aparecimento de mais de uma zona de flocação, como também pela falta de uma indicação segura do "tubo ótimo de flocação" e pelo longo tempo necessário para a visualização do floculado (2).

Ramon (12) preconizava, para a eliminação do aparecimento de mais de duas zonas de flocação, a utilização de toxinas obtidas de culturas jovens, com mínimo de material proteico, e soros de animais hiperimunizados, com ausência de anticorpos antimicrobianos.

Goldie, Parsons & Browers (4), utilizando soros purificados, conseguiram obter uma única zona de flocação nas titulações. Todavia, não conseguiram reduzir o tempo de flocação (Kf).

Rangel (14) obteve uma só zona de flocação com o emprego de toxinas purificadas para a titulação de antitoxinas tetânicas, porém não se preocupou com o tempo transcorrido para o aparecimento do floculado.

A introdução de alguns detalhes, no processamento dos componentes, permite obter uma única zona de flocação, em tempo razoavelmente curto, utilizando soros purificados pelo método de Pope (11) e filtrados tóxicos não purificados, na titulação das toxinas e anatoxinas tetânicas.

Material e Métodos

Soro — Foi utilizado soro antitetânico purificado e concentrado através da digestão péptica, pelo método de Pope (11), produzido no Instituto Butantan, pela hiperimunização de cães. Este soro foi padronizado pela antitoxina

* Secção de Toxinas e Anatoxinas do Instituto Butantan, Caixa Postal 65, 01000 São Paulo SP.

tetânica Padrão Internacional procedente de Statens Serum Institut da Dinamarca (WHO) e o seu título foi ajustado a 25Lf/ml.

Toxinas e anatoxinas — As toxinas e anatoxinas ensaiadas foram obtidas de um filtrado estéril de cultura de *Clostridium tetani* cepa B-89, em meio digesto de carne, e tituladas de acordo com as exigências mínimas. Os títulos das toxinas usadas oscilavam entre 15 a 30Lf, e os das anatoxinas, de 10 a 30Lf/ml.

Foram utilizadas séries de tubos de ensaio medindo 10 × 23mm e, cada série, composta de dez tubos. Em cada tubo, foram colocadas quantidades variáveis e crescentes de soro sub-padrão anti-tetânico. Em seguida, eram adicionados 2ml de toxina ou anatoxina tetânica a ser dosada, e completado o volume com diluente. Cada amostra dava origem a duas séries de tubos.

Para todas as séries, o pH dos抗ígenos foi ajustado entre 4,7 a 5,2, com auxílio de solução de HCl, a 0,1N. Uma série, após a mistura e homogeneização, era mantida à temperatura ambiente, servindo como controle, e a outra sofria o processo de resfriamento prévio, em geladeira, a 4°C, antes de ser incubada em banho-maria a 42°C.

Para a série submetida a tratamento em geladeira, a 4°C, foram testados vários tempos de resfriamento prévio, a partir de 30 minutos, até 12 horas de observação.

Foram feitos, em seguida, experimentos idênticos, porém promovendo o resfriamento prévio de uma das frações. Desta maneira, tanto os抗ígenos, como os anticorpos foram resfriados separadamente e alternadamente, antes de serem efetuadas as misturas, durante o período de 30 minutos, a 4°C. Este procedimento tinha o objetivo de detectar a fração responsável pela determinação do abreviamento da reação de neutralização antígeno-anticorpo.

Controle de floculação das toxinas e anatoxinas — Afim de comprovar as observações, decidiu-se identificar o "tubo ótimo de floculação" distinguindo-o de uma possível pseudo-floculação. Além disso, era necessário verificar se este tubo realmente correspondia ao de neutralização total. Para tanto, utilizou-se a técnica preconizada por Girard, Nicol & Turpin(3), constatando-se que, realmente, o "tubo ótimo de floculação" era aquele que primeiramente havia floculado, e onde a neutralização era perfeita, comprovando-se assim não tratar-se de falsa floculação.

Resultados

O resfriamento prévio das misturas de toxinas ou anatoxinas tetânicas, com a antitoxina homóloga, associado ao acerto de pH da fração antigênica, determina o abreviamento do tempo de floculação específica (Kf).

Os resultados referentes à variação do tempo de floculação em função do período de resfriamento prévio da mistura抗ígeno-anticorpo tetânico, estão representados na Tabela 1.

Tabela 1 — Variação do tempo de floculação da toxina tetânica, em função do período de resfriamento prévio, a 4°C da mistura抗ígeno-anticorpo

Toxina nº	Período de resfriamento prévio em minutos					
	Controle	30	60	120	180	720
70-1	150	40	60	75	60	30
70-3	180	80	60	90	70	40
70-4	140	30	35	70	90	40
70-5	150	40	45	60	80	30
70-6	170	40	60	105	100	35
70-7	160	45	50	70	60	35
70-8	120	45	50	60	90	40
Kf médio	153	45	51	75	78	35

Comparando-se o Kf do sistema constituído de toxina-antitoxina mantido à temperatura ambiente, cuja média era de 153 minutos, com o submetido ao tratamento térmico a 4°C, verifica-se, neste, uma redução significativa do tempo de aparecimento do floculado, com o Kf médio de 45 minutos.

Tabela 2 — Variação do tempo de floculação da anatoxina tetânica, em função do período de resfriamento prévio, a 4°C da mistura抗ígeno-anticorpo

Toxina nº	Período de resfriamento prévio em minutos					
	Controle	30	60	120	180	720
69-64	227	158	122	150	148	160
69-65	240	155	130	129	128	130
69-66	235	75	80	90	80	100
69-67	187	61	127	146	127	101
69-68	245	61	127	147	127	95
70-03	300	138	129	140	150	180
Kf médio	239	108	119	133	126	127

Tabela 3 — Tempo de floculação da toxina e antitoxina tetânica em função do resfriamento prévio de 30 minutos, a 4°C

Toxina			Antitoxina		
Nº	Amostra	Controle	Nº	Amostra	Controle
77-10	85	85	Z-35	35	50
77-11	90	90	Y-130	55	60
77-12	41	40	D-144	15	32
77-13	60	60	76-49	23	30
77-14	60	65	76-50	20	30
77-00	40	40	76-00	30	50
Média	62	63		30	42

Em relação às anatoxinas, houve, também, diminuição significativa do Kf, pois, de 239 minutos, na série controle, ficou reduzido para 108 minutos (Tabela 2). A comparação das médias dos diversos experimentos, revela que a exposição às condições de geladeira, até o período de três horas, leva a um fenômeno que se traduz por aumento progressivo dos valores de Kf, que se mantêm na faixa de 120 a 130 minutos, mesmo quando a refrigeração se dá durante 12 horas.

Na Tabela 3, está representado o estudo do comportamento do tempo de floculação da reação com a toxina e com a antitoxina tetânica, quando isoladamente submetidas ao tratamento térmico, a 4°C, antes de serem misturadas. O resfriamento da fração antigênica não influenciou significativamente sobre o tempo de floculação; todavia, o tratamento térmico da fração antitóxica parece ser o fator determinante da velocidade de reação de floculação.

Discussão

Apesar dos inúmeros estudos terem contribuído para o aperfeiçoamento da técnica de dosagem das toxinas e anatoxinas "in vitro", os resultados conseguidos, nem sempre foram plenamente satisfatórios ou concordes. Na literatura consultada, verificamos que a maioria dos autores se preocupou com a obtenção de uma única zona de floculação, deixando de focalizar o assunto relacionado com o controle da cinética da reação de neutralização (2, 6, 10, 13, 14, 15).

Quanto à obtenção de única zona de floculação, os nossos resultados foram concordantes com os de Goldie & col.(4), com o emprego de soros purificados pela técnica de Pope (11),

correspondentes à fração gama globulina, comprovada previamente pela eletroforese.

A temperatura inicial do sistema antígeno-anticorpo associado ao ajuste prévio do pH do antígeno parecem ser os fatores mais importantes, que indicam a aceleração da reação de neutralização, aumentando o grau de afinidade entre os reagentes.

A velocidade de reação de precipitação pode ser explicado, em parte, baseando-se nos princípios físico-químicos(1, 7) onde atuam, em diversos graus, as forças de Van der Waals(9) entre as moléculas constituintes do complexo antígeno-anticorpo; e, em parte, pelas forças iônicas, representadas pelas cargas opostas, em íntimo contato, apresentadas pelos reagentes. Estas forças iônicas são geralmente máximas, em condições ideais de pH e potência iônica. Em valores inferiores a pH 3 ou superiores a 10, são tão fracas, que o complexo antígeno-anticorpo se dissocia(5). Em virtude da toxina e anatoxina se encontrarem homogeneamente dispersas em toda a extensão do meio, sob a forma estável de partículas coloidais(8), o ajuste prévio de pH favorece a reação, orientando e ativando a energia das forças atrativas.

Quanto à influência da temperatura, sabe-se que dentro de certos limites, quase todas as reações bioquímicas se realizam com velocidade maior, quando elevada a temperatura, fenômeno explicável pela teoria cinética(9). O acerto prévio da temperatura do anticorpo, ou do sistema antígeno-anticorpo, provavelmente, aumentaria a energia potencial, que se transformaria em energia cinética, quando expostos às condições de banho-maria, resultando em considerável aumento do número de colisões entre as moléculas reagentes, de tal ordem que determinaria a aceleração da reação de neutralização e, consequentemente, em abreviamento do tempo de floculação.

Referências Bibliográficas

1. Damjanovic, V. & Jovic, M. — Fast and slow flocculating systems of diphtheria antigen-antibody in Ramon, Deam-Webb and mass law methods. *Progr. Immunobiol. Standard.*, 3:346-349, 1969.
2. Darzine, E. — Études sur la floculation des mélanges de toxine et d'antitoxine tétaniques. *Ann. Inst. Pasteur*, 43:1599-1629, 1929.
3. Girard, O.; Nicol, L. & Turpin, A. — Les floculations contrôlées. *Ann. Inst. Pasteur*, 109:151-154, 1965.
4. Goldie, H.; Parsons, C.H. & Browers, M.S. — Titration of tetanal toxins, toxoids and antitoxins by the flocculation test. *J. Infect. Dis.*, 71:212-219, 1942.
5. Humphrey, J.H. & White, R.G. — *Imunologia Médica*. 3^a ed. Rio de Janeiro, Guanabara-Koogan, 1972.
6. Levine, L.; Ipsen Jr., J. & Mec Comb, J.A. — Preparation and evaluation of combined fluid tetanus and diphtheria toxoids for adult use. *Amer. J. Hyg.*, 73:20-35, 1961.
7. Levine, L. & Wyman, L. — The flocculation test and the law of mass action. *J. Immunol.*, 94:586-591, 1965.
8. London, F.S. & Aristovsk, V.W. — Nouvelle méthode de séparation des toxines, en particulier de la tétanotoxine. *C.R. Soc. Biol. (Paris)*, 80:756-758, 1917.
9. Mellor, J.W. — *Química Inorgânica Moderna*. 3^a ed. Rio de Janeiro, Globo, 1955.
10. Moloney, P.S. & Hennessy, S.N. — Titration of tetanal toxins and toxoids by flocculation. *J. Immunol.*, 48: 345-354, 1944.
11. Pope, C.G. — Disaggregation of proteins by enzymes. *Brit. J. exp. Path.*, 19:245-251, 1938.
12. Ramon, G. — Sur la floculation dans les mélanges de bouillon tétaniques filtré et de sérum antitétanique. *C.R. Soc. Biol. (Paris)*, 124:414-416, 1937.
13. Ramon, G. & Descombez, P. — Sur l'appréciation de la valeur antigénique de la toxine et de l'anatoxine tétaniques par la méthode de la flocculation. *C.R. Soc. Biol. (Paris)*, 95:434-436, 1926.
14. Rangel, H.A. — Titrage des sérum antitétaniques non purifiés par flocculation. *Rev. Immunol. (Paris)*, 19:400-403, 1955.
15. Smith, M.L. — La standardisation du sérum antitétanique, facteurs influençant le titrage. *Bull. Org. Hyg.*, 7: 797-831, 1938.

Diferentes temperaturas e meios de cultura para o isolamento de *Salmonella* sp. e outras bactérias, em rações iniciais para frangos de corte

Eliana Pinheiro de Carvalho*
& Luiz Carlos Gonçalves Costa**

Resumo

Visando a recuperação de *Salmonella* sp. com vistas a eliminar a competição de outros microrganismos, fez-se o estudo de 30 amostras de rações, variando-se meios de cultura para recuperação e utilizando-se três temperaturas de incubação, 35, 37 e 43°C. Foram identificadas dois sorotipos de *Salmonella* (*S. agona* e *S. anatum*), em uma única ração, à temperatura de 43°C, nos meios selenito cistina, verde brilhante e SS agar. O selenito cistina se mostrou mais eficiente na recuperação de colônias, sendo superior ao tetrationate em 14,19%, com alto índice de microrganismos competidores.

Summary

Different temperatures and culture media for isolation of Salmonella sp. and other microorganisms in broiler starter rations

Isolation of *Salmonella* spp. to eliminate competition by other microorganisms. The experiment was performed on thirty samples of ten broiler starter rations, used commercially in the region, by employing different selective culture media and three incubation temperatures: 35, 37 and 43°C. Two serotypes of salmonella (*S. agona* and *S. anatum*) were identified only in one broiler starter ration at 43°C, and using selenite cystine broth, brilliant green agar and SS agar. Selenite cystine was found to be most efficient for isolation of colonies, 14.19% superior to tetrionate in all broiler starter rations studied and, at 35°C, there was a high ration of microorganisms in competition with each other.

Introdução

Quando salmonelas estão presentes no alimento, em geral seu número é pequeno em relação ao resto da microflora. Por conseguinte, torna-se necessário o emprego de meios de pré-enriquecimento seletivo para melhor isolamento. North (13) notou que a recuperação de *Salmonella* com o pré-enriquecimento de amostras, aumenta consideravelmente quando em caldo lactosado, seguido de caldo selenito cistina Galton & col., citados por Fagerberg & Avens (5), afirmaram ser difícil recuperar salmonelas sem enriquecimento seletivo, pois a

proporção de coliformes para salmonelas encontrada foi de 10:1.

Pesquisadores tem relatado a influência de elevadas temperaturas de incubação, nos meios enriquecedores.

O método de análise citado por Horwitz (8) não recomenda, em seus procedimentos para análise de *Salmonella*, temperatura elevada de incubação para os meios enriquecedores, mas Harvey & Thronson (7), testaram o caldo selenito cistina na recuperação deste microrganismo, a 42, 43 e 44°C, comparadas com 35 – 37°C e indicaram ser melhor a incubação a 43°C. Isto foi confirmado por Carlson & col.

* Departamento de Ciência dos Alimentos da Escola Superior de Agricultura de Lavras, 37200 Lavras, M.G.

(3), que afirmaram que a multiplicação de salmonelas à 43°C, em caldos enriquecedores, além de mais rápida, reduzia a competição.

Segundo McCoy (11), o meio de tetrationato, incubado a 43°C, era letal para salmonelas e maioria dos microrganismos, e o isolamento de salmonelas, em selenito cistina incubado a 43°C, era significativamente menor que a incubação a 37°C.

Face à importância do isolamento de salmonelas em rações, o presente trabalho teve como objetivo determinar os melhores meios de enriquecimento e respectivas temperaturas de incubação, para o isolamento deste microrganismo.

Material e Métodos

Foram examinadas 30 amostras de rações para aves, obtidas nos distribuidores da região Sul de Minas Gerais. Para efeito de identificação, as rações foram codificadas de acordo com a procedência, sendo designadas por letras de "A" a "J".

Utilizando-se recipientes estéreis, foram coletadas para exame 25g de cada amostra de ração.

As etapas usadas para o isolamento de salmonelas foram as preconizadas por Thatcher & Clark (19):

1. pré-enriquecimento;
2. enriquecimento seletivo;
3. seletivos indicadores;
4. provas bioquímicas e
5. sorologia.

Os meios de cultura utilizados foram os citados por Horwitz (8) e Silliker & Gabis (15, 17).

Em todas as etapas de identificação inicial dos microrganismos, foram usadas três temperaturas de incubação: 35, 37 e 43°C durante 24 horas.

O pré-enriquecimento foi feito com 225ml do caldo lactosado e 25g da amostra de ração. Deste, tomaram-se alíquotas de 1ml que foram transferidas para caldos de enriquecimento seletivo (selenito cistina e tenerationato) e posteriormente repicados em meios seletivos indicadores (agar *salmonela shigella* e agar verde briilhante).

Como foram usadas, nestas etapas, três temperaturas de incubação para cada amostra, ao final de identificação inicial obteve-se o número total de 360 placas, para todo o experimento (12 placas para cada amostra).

De todas as placas com crescimento foram retiradas colônias que apresentavam características morfológicas diferentes e repicadas em

Triple Sugar Iron agar (TSI) e levadas posteriormente às provas bioquímicas. Estas foram feitas pelo sistema API 2OE (21). A identificação de *Salmonella* sp. foi considerada presuntiva e confirmada pelos testes sorológicos, no Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.

Resultados e Discussão

Os resultados mostraram a presença de microrganismos em todas as rações e nos diferentes meios de cultura e temperaturas de incubação utilizadas. Foram identificadas 275 colônias (Tabela 1).

O material oriundo do tenerationato, quando incubado a 43°C, mostrou baixa recuperação de colônias, menor que o selenito cistina, concordando com McCoy (11) e Silliker & Gabis (16).

Gênero *Salmonella* — Foram encontrados dois sorotipos de *Salmonella enteritidis* respectivamente *S. anatum* e *S. agona* identificada pelo Instituto Oswaldo Cruz.

O sorotipo *S. anatum*, identificado neste trabalho, foi também encontrado por Silva & col. (18) e Tonev (20), que estudaram a distribuição de *Salmonella* em matérias primas destinadas à fabricação de ração.

As salmonelas foram identificadas a 43°C, provenientes de caldo selenito cistina e dos seletivos indicadores (Tabela 1). Este resultado concorda com os obtidos por Silliker & Gabis (16) e Harvey & Thomson (7), que estudaram caldo tenerationato e selenito cistina a 35 e 43°C. A detecção, a partir do caldo selenito cistina, concorda com McCoy (11), que notou baixa recuperação de colônia de *Salmonella* e outros microrganismos no caldo tenerationato a 43°C.

O baixo número de colônias recuperadas pode ter sido influenciado pelo aparecimento de *Pseudomonas* sp., capaz de inhibir o crescimento de *Salmonella*, como explica Oblinger (14), que estudou a produção de pigmentos destas colônias como causa de inibição para o crescimento de *Salmonella* sp. e *E. coli* em carne de aves. Isto também é discutido por Cox & Williams (2), que afirmam que o pequeno número de *Salmonella* pode ser atribuído a efeito de outros microrganismos competidores.

Gênero *Klebsiella* — A presença de grande número de espécimes deste gênero nas rações sugere a contaminação fecal, como explica Knittel, citado por Newton & col. (12), quando estudou amostras de carne. Davis & col. (4), se referem a *K. pneumoniae* como o patógeno mais importante deste gênero.

A menor recuperação foi a 43°C e não houve

Tabela 1 — Espécies bacterianas identificadas de rações estudadas em diferentes temperatura e meios cultura.

Espécies Bacterianas	Temperaturas (°C)												Total de Colônias	
	35				37				43					
	Meios de Cultura													
	TTVB	TTSS	SCVB	SCSS	TTVB	TTSS	SCVB	SCSS	TTVB	TTSS	SCVB	SCSS	Recuperadas	
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	7	8	4	8	5	5	10	9	4	—	7	8	75	
<i>Enterobacter cloacae</i>	11	6	8	3	12	6	10	5	—	3	8	3	75	
<i>Enterobacter aerogenes</i>	1	7	1	3	4	5	2	1	1	—	4	1	30	
<i>Enterobacter agglomerans</i>	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	3	3	
<i>Citrobacter freundii</i>	1	1	3	1	—	5	—	5	1	1	—	—	16	
<i>Proteus mirabilis</i>	1	—	1	2	—	1	1	1	—	—	—	1	8	
<i>Arizona sp.</i>	3	2	1	—	2	—	—	—	—	—	—	—	8	
<i>Escherichia coli</i>	3	2	8	8	3	3	2	4	—	3	3	7	46	
<i>Pseudomonas sp.</i>	—	2	1	5	—	1	—	2	—	—	1	—	12	
<i>Salmonella sp.</i>	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	1	2	
T por meio de cultura	27	28	27	30	26	24	25	27	6	7	24	24		
O														
T														
A														
L por temperatura				112				102			61		275	

TTVB — Caldo tetrattonato e agar verde brilhante

TTSS — Caldo tetrattonato e agar *Salmonella Shigella*

SCVB — Caldo selenito cistina e agar verde brilhante

SCSS — Caldo selenito cistina e agar *Salmonella Shigella*

recuperação nos meios c. tetrationato e SS agar, nesta temperatura (Tabela 1).

O caldo selenito cistina, com repicagem em agar verde brilhante, apresentou maior número de colônias a 37°C. Também nesta temperatura houve maior recuperação de colônias.

Estes microrganismos fermentam todos os carboidratos usados nas provas bioquímicas, tendo Cox & Williams (2), afirmado que fermentam glicose, lactose, sacarose, manitol, maltose e dulcitol. Os resultados obtidos concordam, no que se refere à glicose, manitol e sacarose. Os outros açúcares testados neste experimento tais como inositol, sorbitol, ramose, melobiose, amigdalina e arabinose, não foram citados por aqueles autores.

Gênero Enterobacter — Foram identificadas 3 espécies: *E. cloacae*, *E. aerogenes* e *E. agglomerans*.

E. cloacae foi identificada em todas as rações estudadas. Sua maior recuperação ocorreu à 37°C, não ocorrendo grande interferência quando os meios eram incubados a 43°C.

O caldo tetrattonato a 43°C (Tabela 1), foi quase letal para este gênero, mostrando, somente com repicagem em SS agar, 3 colônias, situação semelhante à obtida por McCoy (11).

Com relação a *E. aerogenes*, foram isoladas o maior número de colônias recuperadas deu-se à 35 e 37°C, em TTSS.

E. agglomerans somente foi recuperada a

43°C, nos meios selenito cistina e SS agar, no total de 3 colônias.

Gênero Citrobacter e Proteus — A espécie identificada do gênero *Citrobacter* foi *C. freundii* (Tabela 1), com 16 colônias em um total de 5,8% das 275 colônias examinadas.

Como mostra a Tabela 1, o maior número de colônias de *C. freundii* recuperadas deu-se a 37°C, em cultura de selenito cistina e repicagem em SS agar.

P. mirabilis foi a única espécie do gênero *Proteus* identificada, no total de 8 colônias. Pode-se notar (Tabela 1) que a presença desta bactéria em agar verde brilhante foi positiva, o que vem a discordar de Silva & col. (18), que afirmam usar o referido meio para inibir o crescimento de *Proteus*. Talvez os autores tenham se referido ao meio agar verde brilhante como inibidor, no sentido de diminuir a competição e não de inibição.

O meio SS agar rendeu o maior número de colônias recuperadas, sendo 35°C a temperatura a mais favorável.

A temperatura de 43°C, com apenas uma colônia, proveniente de selenito cistina e repicagem em SS agar, pode ser mostrada como uma das formas de eliminar estes organismos, tidos como competidores com *Salmonella*, como afirma Carlson & col. (3).

Gênero Arizona — O gênero foi detectado nas amostras de rações das cinco fábricas. Este gê-

nero foi isolado por Avila & Moreira (1), ao estudar sua presença em frangos de corte.

Não houve recuperação (Tabela 1) a 43°C e, a 35°C, isolou-se o maior número de colônias, com os meios tetratrationato e verde brilhante, revelando índice superior aos demais.

Gênero Escherichia — A espécie *E. coli* não foi detectada em somente duas das rações. Das demais, foram obtidas 46 colônias. *E. coli* também foi detectada em rações por Manrique & col. (10).

Esta bactéria, encontrada com reais freqüências à temperatura 35°C, recuperou-se melhor a partir do meio de enriquecimento seletivo selenito cistina (Tabela 1).

Gênero Pseudomonas — *Pseudomonas* sp. foi detectada em 4,4% das 275 colônias examinadas, nos meios usados para determinação de enterobacteríaceas, apesar de não pertencerem a esta família. Também Giorgi & col. (6) detec-

taram *Pseudomonas* em farinhas destinadas à fabricação de ração.

O maior número de colônias isoladas (Tabela 1) foi a 35°C e nos meios selenito cistina e SS agar. A 43°C, com selenito cistina e verde brilhante, uma colônia foi identificada.

Nas condições em que esta pesquisa foi realizada, concluiu-se que:

1. *Salmonella anatum* e *Salmonella agona* foram isoladas a 43°C, em meios SS agar e verde brilhante;

2. para todas as bactérias identificadas, o selenito cistina se mostrou mais eficiente na recuperação de colônias, sendo superior ao tetratrationato em 14,19% em todas as temperaturas utilizadas; e

3. pode-se notar que todos os meios utilizados a 35°C mostraram alto índice de microrganismos competidores, seguida pelas temperaturas de 37 e 43°C.

Referências Bibliográficas

1. Avila, F.A. & Moreira, E.C. — Isolamento e identificação de germes do grupo *Arizona* de aves doentes e aparentemente saudáveis em Belo Horizonte. Arq. Esc. Vet. Univ. Fed. M. Gerais (Belo Horizonte), 28:189-191, 1976.
2. Cox, N.A. & Williams, J.E. — A simplified biochemical system to screen *Salmonella* isolates from poultry for serotyping. Poult. Sci. (New York), 55:1968-1971, 1976.
3. Carlson, V.L.; Snoeyenbos, B.A.M. & Smyser, C.F. — A comparison of incubation time and temperature for the isolation of *Salmonella*. Avian Dis. (New York), 11:217-225, 1977.
4. Davies, B.D.; Dlbecco, R.; Eisen, H.N.; Ginsberg, H.S. & Wood Jr., W.B. — Os bacilos entéricos. In: — Microbiologia. São Paulo, EDART, 1973. p. 155-187.
5. Fagerberg, D. & Avens, J.S. — Enrichment and planning methodology for *Salmonella* detection in food. J. Milk Fd. Technol. (Albany), 39:628-646, 1976.
6. Giorgi, W.; Ohashi, K. & Araújo, W.P. — Farinha de peixe e farinha de carne, como fontes de *Salmonella*, para animais. Arq. Inst. Biol. (São Paulo), 38:59-62, 1971.
7. Harvey, R.W.S. & Thomson, S. — The optimum temperature of incubation for isolation of *Salmonellae*. Mon. Buel. Minist. Hlth (London), 12:149-150, 1953.
8. Hortwitz, W. — Methods of analysis of the association of official analytical chemists. 20 ed. Washington, A.O.A.C. 1970.
9. Leitão, M.F.F. — Métodos de identificação de *Salmonella* em alimentos. Bol. ITAL (Campinas), 25:43-68, 1971.
10. Manrique, G.; Ohashi, K. & Araújo, W.P. — Estudio de la contaminación com enterobacteríaceas en concentrados para animales. Rev. Fac. Med. Vet. Zootec. (Bogotá), 32:21-261, 1970.
11. MacCoy, J.H. — The isolation of *Salmonellae*. J. appl. Bact. (Reeding), 25:213-224, 1962.
12. Newton, K.G.; Harrison, J.C.L. & Smith, K.M. — Coliformes form hides and meat. App. Env. Microbiol. (Baltimore), 33:199-200, 1977.
13. North, W.R. — Lactose pre-enrichment of *Salmonella* from dried egg albumen: its use in a survey of commercially produced albumen. App. Microbiol. (Baltimore), 9:188-195, 1961.
14. Oblinger, J.L. & Kraft, A.A. — Inhibitory effects of *Pseudomonas* on selected *Salmonella* and bacteria isolated from poultry. J. Fd. Sci. (Iowa), 35:30-32, 1970.
15. Silliker, J.H. & Gabis, D.A. — Comparison of analytical schemes for detection of *Salmonella* in dried foods. Can. J. Microbiol. (Canadá), 19:475-478, 1973.
16. Silliker, J.H. & Gabis, D.A. — The influence of seletive enrichment media and incubation temperatures on the detection of *salmonellae* in raw frozen meats. Can. J. Microbiol. (Canadá), 20:813-816, 1974.
17. Silliker, J.H. & Gabis, D.A. — Indicator test as substitutes for direct testing of dried foods and feeds for *Salmonella*. Can. J. Microbiol. (Canadá), 22:971-974, 1977.
18. Silva, E.N.; Reis, R.; Oliveira, R.L. & Avila, F.A. — Salmonelas em farinhas de origem animal destinadas à fabricação de rações. Arq. Esc. Vet. Univ. Fed. M. Gerais (Belo Horizonte), 25:169-173, 1973.
19. Thatcher, F.S. & Clark, D.S. — Microorganisms in foods their significance and methods of enumeration. Toronto, University of Toronto Press, 1968.
20. Tonev, M. — Studies on the microflora of bone meal. Vet. Med. (Sofia), 5:25-32, 1968.
21. USA Analytab products — api 20E Analytical profile index, 1976.

**Estudo comparativo
entre o conteúdo de
esteróis e resistência
a polienos em diferentes
espécies de leveduras***

Mário Tsunezi Shimizu*
& Flávio Alterthum***

Resumo

Dosagem do conteúdo de ergosterol e 24 (28) dehidroergosterol em *Saccharomyces cerevisiae*, *Torulopsis glabrata*, *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis* e *Candida krusei*, nas fases logarítmica e estacionária de crescimento. O conteúdo de esteróis foi maior na fase estacionária para as quatro primeiras leveduras, permanecendo praticamente inalterado nas duas últimas. Ao realizar, simultaneamente, a determinação da concentração mínima inibitória (MIC) frente à nistatina e anfotericina B, utilizando, como inóculo, células provenientes das duas fases do crescimento, não constatamos as mesmas variações. Assim sendo, embora seja indispensável a presença de esteróis na membrana citoplasmática, para que o microrganismo seja suscetível, não foi possível estabelecer uma correlação entre o conteúdo de esteróis e resistência aos polienos. Outros fatores devem estar implicados na susceptibilidade das leveduras testadas.

Summary

Sterol amounts in cell membrane and resistance of yeasts to poliene antibiotics

The amounts of ergosterol and 24 (28) dehydroergosterol were determined in cells of *Saccharomyces cerevisiae*, *Torulopsis glabrata*, *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis* and *Candida krusei*, the harvested in both, the exponential and stationary phases of growth. The first four types had a significantly higher amount of sterols in the stationary phase cells; no significant differences were observed for the cells of *C. tropicalis* and *C. krusei*. Simultaneous determinations of the minimal inhibitory concentrations (MIC) of nystatin and amphotericin B did not reveal the same differences between the two types of cells. Although the presence of sterols is necessary for the organism to be susceptible to those antibiotics it was not possible to establish a correlation between the amount of sterols present and the degree of resistance to the polyenes used. Other factors are probably concerned in the sensitivity of the yeasts tested.

Introdução

Microrganismos sensíveis aos antibióticos poliênicos devem ter necessariamente esteróis incorporados à sua membrana citoplasmática. Esta afirmativa pode ser feita a constatação dos seguintes fatos: a — células íntegras, protoplastos e membranas isoladas de organismos sensíveis permitem que quantidades razoáveis

de nistatina, anfotericina B e filipina se liguem a elas, ao passo que células íntegras, protoplastos e membranas isoladas de organismos resistentes não se combinam com estes antibióticos (2,6,13,14,16,17); b — há uma correlação estreita entre a capacidade das várias frações subcelulares de *Saccharomyces cerevisiae* fixarem a nistatina e o correspondente conteúdo em esteróis (14); c — os esteróis podem prote-

* Trabalho realizado com auxílio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, Processo 74/1102

** Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, U.N.E.S.P., 14800 Araraquara SP.

*** Instituto de Química da U.S.P., Caixa Postal 20780, 01000 São Paulo SP.

ger células sensíveis, inibindo a ação dos polienos (7,9,15,19); d — digitonina, substância capaz de complexar esteróis, também o faz com os polienos (14); e — membranas que tiveram seus esteróis extraídos com solventes não são capazes de ligar os polienos. A pré-incubação de tais membranas com os esteróis todavia, restabelece a capacidade de ligação (13).

Embora seja sugerida a correlação conteúdo de esterol e susceptibilidade, não sabemos até que ponto ela pode ser responsabilizada pela maior ou menor sensibilidade aos polienos. Os recentes trabalhos com lipossomas têm mostrado a participação de outros fatores que influem na referida susceptibilidade (11). Huschen & Feingold (11) atribuem um papel de destaque à composição química e distribuição dos fosfolipídeos bem como ao próprio arranjo dos componentes da membrana. Além disso, Gale (7) encontrou esteróis na parede da *Candida albicans*, os quais poderiam combinar-se com os polienos, união esta que não traria consequências para a célula, mas inativaria parte do antibiótico.

O presente trabalho tem como objetivo avaliar o conteúdo de esteróis de diferentes espécies de leveduras, tanto em fase logarítmica como estacionária de crescimento e correlacioná-lo com as concentrações mínimas inibitórias (MIC) da nistatina e anfotericina B.

Material e Métodos

Microrganismos — Foram utilizados os seguintes microrganismos: *Saccharomyces cerevisiae*, NCY 366, *Torulopsis glabrata*, *Candida albicans*, *C. tropicalis*, *C. krusei* e *C. parapsilosis*. O primeiro foi cedido pelo Prof. A.H. Rose e os demais obtidos da Micoteca do Instituto de Ciências Biomédicas da USP.

Meios de cultura — Os microrganismos foram mantidos em extrato de malte ágar (Oxoid Ltd., London, England) repicados mensalmente. A determinação da MIC foi realizada em Antibiotic medium 21 (Difco Laboratories Inc., Detroit, Michigan, USA). Para a dosagem de esteróis, as leveduras foram cultivadas em meio YPD constituído de extrato de levedura, 0,6g, peptona, 0,8g e glicose, 2,0g, em 100ml de água.

Antibióticos — A nistatina e a anfotericina B, gentilmente cedidas pela Squibb, Indústrias Químicas S.A., foram conservadas sob forma micropulverizada a 4°C e, no momento do uso,

dissolvidas em dimetilsulfóxido, diluídas em água e utilizadas nas concentrações desejadas.

Determinação do MIC — Foi utilizado o método de Shadomy & Espinel-Ingroff (18), empregando tubos contendo 4,9ml do meio descrito acima. O inóculo empregado foi de 0,1ml de uma suspensão preparada da seguinte maneira: 50ml de YPD em erlenmeyer de 250ml, foram inoculados, com uma alcada da levedura a ser testada, incubados a 30°C em agitador rotatório, por 24 horas; 0,1ml deste pré-inóculo foi semeado em 30ml de YPD, em erlenmeyer de 250ml, contendo um tubo acoplado lateralmente e a suspensão incubada a 30°C em agitador rotatório. O crescimento da levedura foi acompanhado, fazendo-se leituras da densidade óptica através do tubo lateral, em espectrofotômetro Coleman Jr II (550nm), até atingir a fase de crescimento desejado. A seguir, as células foram separadas por centrifugação (12.100 × g) por 5 minutos, a 4°C e o precipitado foi ressuspenso em água destilada estéril. Após três lavagens, a densidade óptica do material suspenso em água foi ajustada a 0,6 (Coleman Jr II, 550nm) e utilizado para inocular os tubos para a determinação da MIC.

Dosagem dos esteróis — Os microrganismos foram cultivados em 120ml de YPD, contidos em erlenmeyer de 1l e inoculados com 0,4ml do pré-inóculo. A incubação foi efetuada a 30°C em agitador rotatório e as culturas, ao atingirem a fase de crescimento desejado, foram centrifugadas, lavadas três vezes com água destilada estéril e, a seguir, liofilisadas. Os esteróis foram dosados pelo método de Breivik & Owades (1).

Análise dos esteróis por cromatografia em camada delgada — Os microrganismos foram cultivados em YPD (240ml) em erlenmeyer de 2l, até atingirem as fases de crescimento desejado e, a seguir, centrifugados (12.500 × g, a 4°C) e lavados duas vezes com água destilada. A 6,0ml do creme de leveduras foram adicionados 6,0ml do creme de leveduras foram adicionados 6,0ml de álcool etílico e 3,0g de hidróxido de potássio e a mistura submetida à digestão (1). Após a extração, 5ml de n-heptano, o solvente do extrato foi evaporado, com corrente de nitrogênio até à secura e o resíduo redissolvido em 0,5ml de clorofórmio. Os extratos e os padrões foram aplicados nas placas de cromatografia em sílica-gel GF 254 (E. Merck, Darmstadt, Germany) de 0,25mm de espessura e a cromatografia foi desenvolvida no sistema solvente, constituído de benzeno-acetona

(80:20v/v). Dada a impossibilidade de se obter o 24(28) dehidroergosterol puro, não foi feito seu padrão, mas, considerando-se que o método de Breivik & Owades (1) dosa tão somente este e o ergosterol, admitiu-se que as manchas encontradas correspondiam a estes dois componentes. Aliás Rose, A.H. (comunicação pessoal) já salientou a dificuldade em separá-los por cromatografia em camada delgada. A revelação foi feita em câmara saturada com iodo.

Resultados e Discussão

Com exceção de *C. tropicalis* e *C. krusei*, as demais leveduras testadas apresentaram MIC maior em células provenientes de culturas em fase estacionária (Tabela 1). Este fato em si é comum na microbiologia, ou seja, células em fase exponencial são mais sensíveis aos agentes antimicrobianos. O curioso entretanto é que o conteúdo em esteróis em *S. cerevisiae*, *C. parapsilosis*, *T. glabrata* e *C. albicans* aumentou na fase estacionária (Tabela 2), o que deveria tornar a célula mais sensível. Vejamos as possíveis hipóteses para explicar estes achados.

A cromatografia em camada delgada de extratos de células, em fase logarítmica revelou,

em todos os casos, a presença de esqualeno, lanosterol e a mistura de ergosterol e 24(28) dehidroergosterol (Figura 1A). Já nas células em fase estacionária, detectamos tão somente o ergosterol e seu precursor imediato, o 24(28) dehidroergosterol (Figura 1B). Isto pode ser explicado, uma vez que as células, ao entrarem em fase estacionária, diminuem a síntese de esteróis, consumindo todos os intermediários. Como método de Breivik & Owades (1) dosa tão somente ergosterol e 24(28) dehidroergosterol, é possível que o valor total de esteróis encontrados em células em fase logarítmica seja maior. Isto explicaria as diferenças de MIC nas duas fases, uma vez que há maior afinidade dos polienos pelos esteróis na seguinte ordem: ergosterol > β -sitosterol > colesterol = lanosterol (4).

Outra possibilidade é que haja biossíntese de outros componentes de parede que tenham afinidade pelos polienos, como já foi demonstrado por Hammond & Klieger (10) em *C. albicans* ou, ainda, que estes componentes não permitam o acesso da droga ao seu alvo, os esteróis (8). Esta hipótese tem o suporte indireto dos trabalhos de Deutch & Parry (5) e Carvalhal (comunicação pessoal), que mostraram haver maior dificuldade em obter-se esferoplastos de *S. cerevisiae* frente a enzimas degradadoras de

Tabela 1 — Concentração mínima inibitória (MIC) de nistatina e anfotericina B, de diferentes espécies de leveduras

Microrganismos	Nistatina (U/ml)		Anfotericina B(μ g/ml)	
	Fase exponencial	Fase estacionária	Fase exponencial	Fase estacionária
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	20,90	36,60	3,30	5,00
<i>Candida parapsilosis</i>	17,80	31,40	4,20	5,00
<i>Torulopsis glabrata</i>	8,30	10,40	0,58	0,84
<i>Candida albicans</i>	3,60	4,70	0,20	0,25
<i>Candida tropicalis</i>	10,50	10,50	0,38	0,38
<i>Candida krusei</i>	12,50	12,50	0,76	0,76

Tabela 2 — Conteúdo de 24(28) dehidroergosterol e ergosterol em diferentes fases do crescimento de leveduras*

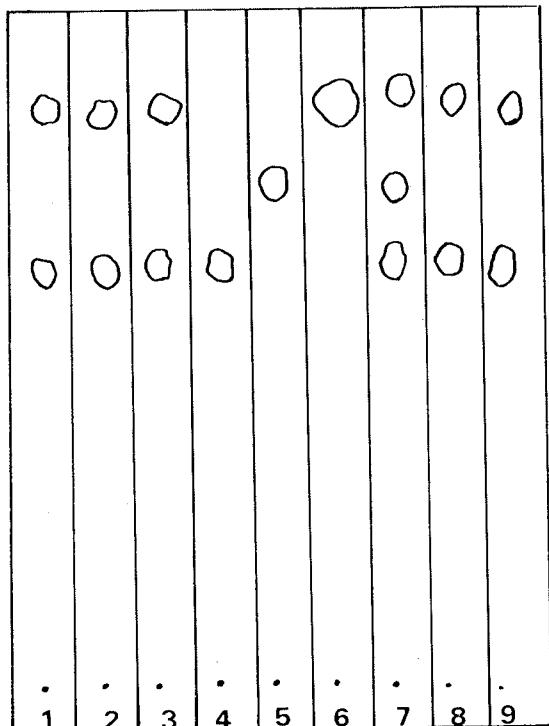
Microrganismos	Fase exponencial		Fase estacionária	
	24(28) dehidro-ergosterol	Ergosterol	24(28) dehidro-ergosterol	Ergosterol
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	0,62 ^a ± 0,15 ^b	0,38 ± 0,11	1,55 ± 0,17	0,64 ± 0,20
<i>Candida parapsilosis</i>	0,12 ± 0,05	0,32 ± 0,04	0,22 ± 0,09	0,42 ± 0,04
<i>Torulopsis glabrata</i>	0,14 ± 0,10	0,36 ± 0,02	0,27 ± 0,09	0,56 ± 0,07
<i>Candida albicans</i>	0,14 ± 0,09	0,34 ± 0,09	0,18 ± 0,06	0,40 ± 0,04
<i>Candida tropicalis</i>	0,11 ± 0,03	0,37 ± 0,02	0,17 ± 0,04	0,36 ± 0,16
<i>Candida krusei</i>	0,15 ± 0,08	0,35 ± 0,04	0,12 ± 0,09	0,35 ± 0,09

* mg/100mg de células liofilisadas
a — média de quatro experimentos

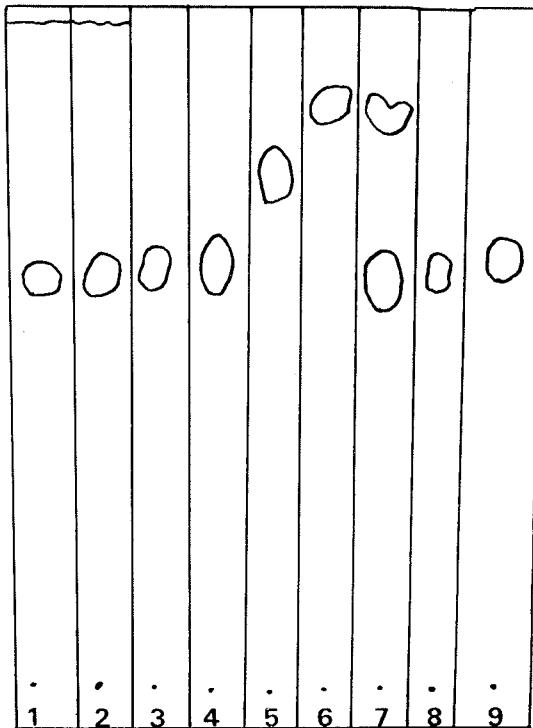
b — desvio padrão da média

Figura 1 — Cromatografia em camada delgada — células provenientes de fase exponencial (1A) e estacionária de crescimento (1B)

- | | |
|--------------------------|----------------------------|
| 1 — <i>C. tropicalis</i> | 6 — Padrão de Esqualeno |
| 2 — <i>C. albicans</i> | 7 — <i>S. cerevisiae</i> |
| 3 — <i>C. krusei</i> | 8 — <i>C. parapsilosis</i> |
| 4 — Padrão de Ergosterol | 9 — <i>T. glabrata</i> |
| 5 — Padrão de Lanosterol | |



1 A



1 B

parede, em células provenientes de fase estacionária.

Finalmente, Camba (3) mostrou, em *S. cerevisiae*, que células com endógeno progressivamente esgotado, tornavam-se mais resistentes à nistatina e, além disso, inibidores de transporte bloqueavam o efeito deste antibiótico. Diante destas observações, podemos admitir que células em fase estacionária sejam mais resistentes pelo fato da disponibilidade energética ser comparativamente menor do que na fase logarítmica, o que explicaria os resultados obtidos.

Em recente trabalho, Huston & Hoeprich (12) encontraram grandes variações nas determinações da MIC, de quatro fungos patogênicos, chamando atenção para as seguintes variáveis: tamanho do inóculo, composição do meio de cultura, condições de incubação tais como, temperatura e tempo de incubação. Nossa trabalho mostra claramente um fator a mais, qual seja, a idade das células. Além disso, demonstra que somente o conteúdo de esteróis não pode ser o indicador de maior ou menor susceptibilidade aos polienos, nistatina e anfotericina B.

Referências Bibliográficas

- Breivik, O.N. & Owades, J.L. — Spectrophotometric semi-microdetermination of ergosterol in yeast. Agricultural and Food Chemistry, 5:360-363, 1957.
- Bulder, C.J.E.A. — Anaerobic growth, ergosterol content and sensitivity to a polyene antibiotic of yeast *Schizosaccharomyces japonicus*. Antonie Van Leeuwenhoek. J. Microbiol. Serol., 37:353-358, 1971.
- Camba, S.A.C. — Aspectos fisiológicos da interação da nistatina com células de *Saccharomyces cerevisiae*. São Paulo, Instituto de Química da Universidade de São Paulo, 1978. (Tese de Doutoramento).
- Carvalhal, M.L.L.C. — Influência de alguns esteróis e ácidos graxos insaturados na ação de nistatina em *Saccharomyces cerevisiae*. São Paulo, Escola Paulista de Medicina, 1974. (Tese de Mestrado).
- Deutch, C.E. & Parry, J.M. — Spheroplast formation in yeast during the transition from exponential phase to stationary phase. J. Gen. Microbiol., 80:249-268, 1974.

6. Feingold, D.S. — The action of amphotericin B on *Mycoplasma laidlawii*. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 19:261-267, 1965.
7. Gale, E.F. — The release of potassium ions from *Candida albicans* in the presence of polyene antibiotics. *J. Gen. Microbiol.*, 80:451-465, 1974.
8. Gale, E.F.; Johnson, A.M.; Kerridge, D. & Koh, T.Y. — Factors affecting the changes in amphotericin B sensitivity of *Candida albicans* during growth. *J. Gen. Microbiol.*, 87:20-36, 1975.
9. Gottlieb, D.; Carter, H.E.; Sloneker, J.H. & Amman, A. — Protection of fungi against polyene antibiotics by sterols. *Science*, 128:361, 1958.
10. Hammond, S.M. & Kliger, B.N. — Mode of action of the polyene antibiotic candididin: binding factors in the wall of *Candida albicans*. *Antimicrob. Ag. Chemother.*, 9:561-568, 1976.
11. Hsuchen, C.C. & Feingold, D.S. — Selective membrane toxicity of polyene antibiotics studies on natural membranes. *Antimicrob. Ag. Chemother.*, 4:316-319, 1973.
12. Huston, A.C. & Hoeprich, P.D. — Comparative susceptibility of four kinds of pathogenic fungi to amphotericin B and amphotericin B methyl-ester. *Antimicrob. Ag. Chemother.*, 13:905-909, 1978.
13. Kinsky, S.C. — Effect of polyene antibiotics on protoplasts of *Neurospora crassa*. *J. Bact.*, 83:351-358, 1962.
14. Lampen, J.O.; Arnow, P.M.; Borowska, Z. & Laskin, A.I. — Location and role of sterol at nystatin-binding sites. *J. Bact.*, 84:1152-1160, 1962.
15. Lampen, J.O.; Arnow, P.M. & Safeerman, R.S. — Mechanism of protection by sterols against polyene antibiotics. *J. Bact.*, 80:200-206, 1960.
16. Lampen, J.O.; Morgan, E.R.; Slocum, A. & Arnow, P. — Absorption of nystatin by microorganisms. *J. Bact.*, 78:282-289, 1959.
17. Razin, S. — Physiology of mycoplasmas. In: — Rose, A.H. & Tempest, D.W. *Advan. Microb. Physiol.*, 10:2-81, 1973.
18. Shadomy, S. & Espinel-Ingroff, A. — Susceptibility testing of antifungal agents, In: — Lennette, E.W.; Spaulding, E.H. & Truant, J.P. — *Manual of clinical microbiology*. 2nd ed. American Society for Microbiology, 1974, p. 559-576.
19. Zygmunt, W.A. & Tavormina, P.A. — Steroid interference with antifungal activity of polyene antibiotics. *Appl. Microbiol.*, 14:865-869, 1960.

Influência de compostos nitrogenados e da relação C/N na obtenção do concentrado proteico de microrganismos

Jocelem Mastrodi Salgado*
& José Renato Sarruge**

Resumo

Estudo da produção de proteína de leveduras e verificação da possível influência da natureza da fonte de nitrogênio e da variação da relação C:N sobre a porcentagem de proteína total. Sal amoniacal, como fonte de nitrogênio em meio sintético, aumenta o porcentual proteico, se comparado ao sal nítrico. Meios contendo 1% de glicose produzem maior conteúdo proteico, independentemente da fonte de nitrogênio.

Summary

Influence of nitrogen compounds and C/N ratio on proteic concentrate of microorganisms

Yeast protein production in laboratory and verification of possible influence of the nature of the nitrogen source and variation of C/N ratio on the percentage of total protein. Ammonium salt as nitrogen source in synthetic medium increases protein percentages as compared to nitrate salt. Media with 1% glucose produce the highest protein content, independent of the nitrogen source.

Introdução

A produção de proteína, para consumo humano e animal, está em franco desenvolvimento, procurando atender à uma necessidade que deverá ser ainda maior, no decorrer da década de 80. Espera-se que a demanda mundial de proteína dobre, até o fim do século.

Atualmente, as fontes mais importantes de proteínas não convencionais no mercado mundial são as farinhas de soja e de peixe. A longo prazo, parecem ser bastante promissoras as proteínas produzidas a partir de processos fermentativos ("single cell protein-SCP).

O Brasil, embora seja um país em desenvolvimento, apresenta acentuado "deficit" de proteínas. Segundo a "Food and Agriculture Organization (FAO)" existem, na população brasileira, cerca de 23 milhões de subnutridos, dos quais 13 milhões estão no nordeste. Essa es-

tística considera subnutridos os indivíduos que recebem menos de 70 gramas de proteínas por dia e, sobretudo menos, que 35 gramas de proteína animal.

Há necessidade, portanto, de ser introduzida fonte protéica rica em aminoácidos essenciais, de baixo preço e de paladar que satisfaça os hábitos alimentares atuais.

Certas leveduras preenchem esses requisitos. Embora *Saccharomyces* sp seja considerada muito exigente em carbono, frágil e de menor palatibilidade, justifica-se plenamente o seu estudo em função do potencial oferecido pela indústria alcooleira e porque seu aproveitamento já é fato consumado no país.

Segundo Desmonts (4), as leveduras alimentares são fragmentadas mortas, tendo perdido o poder fermentativo, normalmente, são produzidas a partir de *Saccharomyces* e *Candida*.

Sua utilização é feita em forma de palhetas,

* Departamento de Tecnologia Rural da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queirós" — USP, 13400 Piracicaba, SP.

** Departamento de Química da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queirós" — USP, 13400 Piracicaba, SP.

em pó, em comprimidos, sob a forma de preparações alimentares, extratos ou hidrolisados. O aproveitamento de levedura não termolisada é desaconselhável, uma vez que é um organismo dotado de atividade fermentativa muito grande (2).

Segundo Desmonts (5), há, atualmente, interesse por parte das indústrias alimentares para o aproveitamento de leveduras, o qual ainda está muito abaixo da realidade.

Por outro lado, a variação de fatores físicos e químicos nos meios de fermentação altera a composição vitamínica, a atividade enzimática das leveduras e provavelmente o teor protéico (4).

A presença de sais de amônio nos meios de cultivo, determina a aceleração contínua na velocidade de fermentação, enquanto que a presença de íons NO_3^- é desfavorável às células de levedura (3).

Oliveira (7), estudando a influência da forma e quantidade de nitrogênio no rendimento protéico das leveduras, verificou que o meio suplementado com sais de amônio foi mais favorável às leveduras, quando comparado com o meio suplementado com nitrato.

O objetivo deste trabalho foi estudar a produção de proteína de levedura em condições de laboratório. Desenvolveu-se ensaios de fermentação para verificar a possível influência da natureza dos compostos nitrogenados e da variação da relação C/N, na porcentagem de proteína bruta.

Material e Métodos

Ensaios de fermentação — Foi utilizado meio básico sintético, fornecendo diferentes quantidades de nitrogênio, na forma nítrica e amoniacal, bem como de glicose, para as leveduras.

Meio sintético básico — Diversos meios foram testados, para verificar a viabilidade de bom desenvolvimento do microrganismo. O meio escolhido foi o apresentado no manual da DIFCO (6) cuja composição é:

glicose	10,0g
KH_2PO_4	1,0g
MgSO_4	0,5g
NaCl	0,1g
CaCl_2	0,1g
Extrato de levedura	2,0 g
Água	completar um litro

Microrganismo — A levedura utilizada foi *Saccharomyces uvarum*, IZ 1831 desenvolvida e conservada em meio de malte inclinado.

O inóculo foi preparado, transferindo-se, com auxílio de alça de platina, células desenvolvidas para erlenmeyer de 500ml contendo 200ml do meio completo devidamente esterilizado. A quantidade de células foi $\approx 10^7$ células/ml. As células foram incubadas durante 24 horas, sob agitação de 90 rpm, em agitador recíproco em temperatura de 26 a 30°C.

Meios de desenvolvimento — Foram preparados 30 frascos erlenmeyer de 500ml, cada qual contendo 200ml do meio básico.

O total de frascos foi subdividido em seis tratamentos, contendo cada qual cinco frascos erlenmeyer, dos quais quatro foram utilizados como repetições na condição do experimento e um deles aproveitado para preparação do inóculo. Os tratamentos foram os seguintes:

meio básico + NaNO_3 1% + glicose 1%
 meio básico + NaNO_3 1% + glicose 5%
 meio básico + NaNO_3 1% + glicose 10%
 meio básico + $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1% + glicose 1%
 meio básico + $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1% + glicose 5%
 meio básico + $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1% + glicose 10%

Após a adição de cada componente, os frascos foram tamponados com algodão e esterilizados por quinze minutos a 121°C.

Inoculação e desenvolvimento — Do inóculo, transferiu-se assepticamente 40ml do conteúdo, perfeitamente homogeneizado por agitação, para os frascos com 200ml de meio, dos diferentes tratamentos.

Os frascos foram mantidos em agitação a 90rpm, em temperatura de 26° a 30°C, por 72 horas, quando considerava-se o processo terminado.

Amostragem e análise — As células obtidas nos ensaios foram separadas por centrifugação a 3600g por 10 minutos, em centrifuga refrigerada a 0°C. Após três lavagens com 100ml de água destilada, as células foram levadas à estufa, a 65°C, por uma noite. Desse material, foram retiradas três amostras de cada tratamento, para a determinação do nitrogênio, total pelo método do microkjeldahl (1).

A proteína bruta foi obtida por multiplicação pelo fator 6,25. O delineamento estatístico foi inteiramente casualizado, de acordo com Pimentel Gomes (8).

Na comparação das médias, utilizou-se o teste de Tukey, segundo Pimentel Gomes (8).

Resultados e Discussão

Os resultados dos teores protéicos das leveduras nas fermentações conduzidas em laboratório, com variação da fonte de nitrogênio (nitrito de sódio e sulfato de amônio), e de teor de glicose (relação C/N) aparecem, na Tabela 1. Os resultados das comparações das médias, pelo teste de Tukey encontram-se na Tabela 2.

Tabela 1 — Teor de proteína de levedura (%) em função da fonte de nitrogênio e do teor de glicose

Tratamentos	Glicose %	Repetições			
		1	2	3	4
NaNO ₃	1	41,20	40,50	43,10	41,50
(NH ₄) ₂ SO ₄	1	47,35	47,30	49,10	49,05
NaNO ₃	5	25,40	25,30	29,15	30,35
(NH ₄) ₂ SO ₄	5	45,15	43,20	45,40	43,05
NaNO ₃	10	28,00	28,40	29,30	28,40
(NH ₄) ₂ SO ₄	10	45,05	48,40	47,30	48,50

CV = 2,12%

Tabela 2 — Comparação das médias pelo teste de Tukey

Glicose %	Fontes	
	NaNO ₃	(NH ₄) ₂ SO ₄
1	40,15	43,95
5	31,63	41,66
10	32,28	43,45

DMS = 1,64

Referências Bibliográficas

- Bailey, J.L. — Techniques in protein chemistry. 2^a ed. Amsterdam, Elsevier, 340-352, 1969.
- Birolaud, P. — Les levures aliment: sources protéine. Ind. Agric. et Alim., 77:635-644, 1969.
- Bourdet, A. — Etude et mesure du pouvoir fermentaire des levures hautes pressées de boulangerie en fonction de la présence de divers éléments nécessaires à leur activité ou susceptibles de l'accroître. Ind. Agric. et Alim., 66:531-537, 1949.
- Desmonts, R. — Tecnologia da produção de fermentos. Bol. Inform. da APM (Piracicaba), 5:1-11, 1966.
- Desmonts, R. — Proteína: um problema alimentar, valor nutritivo da levedura, sua utilização prática para a alimentação humana. Bol. Inform. da APM (Piracicaba), 1-13, 1966.
- Difco — Manual of the treated culture media and reagent for microbiological and clinical laboratory procedures. 9. ed. Michigan, 1953.
- Oliveira, J.S. — Valorização de licores bissulfíticos resíduais. Rev. Ciênc. Agronômicas, p. 1-88, 1968.
- Pimentel Gomes, F. — Curso de estatística experimental. 4^a ed. São Paulo, Livraria Nobel, 1970. 515 p.

Do exame dos dados e da análise estatística, sobre a produção de proteína, variando o sal nitrogenado e a relação C/N, seguem as seguintes apreciações.

a) O sulfato de amônio, no meio sintético, elevou a percentagem de proteína. Talvez isso se deva ao fato de que o nitrogênio amoniacal já esteja reduzido a nível de óxi-redução de nitrogênio protéico, enquanto que o nitrogênio da forma nítrica deve sofrer uma redução prévia. Esses resultados estão de acordo com os encontrados por Oliveira (7) e Bourdet (3).

b) Por outro lado, quando o sal nitrogenado foi NaNO₃, houve diminuição no teor protéico, quando a concentração de glicose foi elevada de 1 para 5 ou 10%. No meio nutritivo, quando o sal nitrogenado foi (NH₄)₂SO₄ houve decréscimo no teor protéico apenas para o tratamento com 5% de glicose.

c) Com o aumento da relação C/N, o decréscimo da percentagem de proteína foi relativamente pequeno para a suplementação com sal amoniacal, maior para a suplementação com sal nítrico, indicando uma dependência entre o teor protéico e a forma de alimentação nitrogenada.

Os resultados deste trabalho mostraram que o sal amoniacal (NH₄)₂SO₄, no meio sintético, elevou a percentagem de proteína no meio, quando comparado com o sal nítrico Na(NO₃). Observou-se, ainda, que, em meios contendo 1% de glicose, a percentagem de proteína foi a mais elevada, independentemente da fonte nitrogenada.

Comportamento "in vitro" do fungo *Aspergillus nidulans* em resposta ao fungicida Plantvax

Pedro Magalhães Lacava*

Resumo

Estudo do comportamento do fungo filamentoso *A. nidulans*, através de seu mutante auxotrófico *pro A 1; paba A 6; y A 1* frente à concentração de 10 — 2560 $\mu\text{g}/\text{ml}$ do fungicida Plantvax em meio sólido, evidenciando a presença de colônias resistentes, além de alterações no crescimento do fungo expressas através das taxas de crescimento das culturas.

Summary

Behavior "in vitro" of the fungus Aspergillus nidulans in response to the fungicide plantvax

Study of behaviorment of the phylamentous fungi *A. nidulans* by means of it's auxotrophic mutant *pro A 1; paba A 6; y A 1* facing the concentration of 10 — 2560 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of the fungicide Plantvax — on solid medium, showing the presence of resistant colonies, besides growth alterations by the growth ratios on cultures.

Introdução

Com a introdução de fungicidas orgânicos que apresentam mecanismos específicos de ação e em alguns casos com características sistêmicas, ampliou-se ainda mais as perspectivas de uso destes defensivos agrícolas. Contudo a introdução, na prática, dos fungicidas sistêmicos com ação altamente específica tornou frequentes os relatos sobre a ocorrência de fitopatogênicos com resistência aos fungicidas. Georgopoulos (2) admitiu que até esta data os raros casos de aparecimento de linhagem de fungos resistentes aos fungicidas deveram-se ao uso de substâncias de natureza não específica no controle de doença em plantas. Os estudos relativos aos mecanismos de resistência aos fungicidas têm demonstrado freqüentemente um relacionamento bioquímico entre o mecanismo de ação do agente tóxico e o mecanismo de resistência do fungo. De acordo com

Van Tuyl (6), um fungicida raramente apresenta um sítio ativo de ação. Então, a resistência é devida à inativação e desintoxicação do composto ou decréscimo da permeabilidade da membrana celular. Com relação aos fungicidas do grupo dos oxatiins, trabalhos de Edginton & Barron (1) e de Snell & col. (5), demonstraram uma ação especificamente tóxica para os basidiomicetos. Ação esta que inibe a produção de energia, conforme Mathre (3, 4) e por White (7).

Material e Métodos

A linhagem de *Aspergillus nidulans* utilizada neste estudo foi a proveniente do setor de Genética de Microrganismos do Instituto de Genética da ESALQ — USP, possuidora de várias marcas genéticas, fato este que permitirá estudos posteriores sobre a resistência genética ao

* Departamento de Microbiologia, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias "Campus" de Jaboticabal, UNESP, 14870 Jaboticabal SP.

fungicida por parte do referido fungo.

Meio de cultura — Meio completo sólido (nitrito de sódio 6g; cloreto de potássio 0,52g; sulfato de magnésio $7H_2O$ 0,52g; fosfato dihidrogenado de potássio 1,52g; sulfato de ferro e sulfato de zinco traços; dextrose 10g; peptona 4g; extrato de levedura 1g; caseína hidrolisada 25ml e solução de vitamina 10ml. Ajuste do pH para 6,5 e esterilização por autoclavagem a 121°C durante 15 minutos.

Fungicida — O fungicida Plantvax (4,4-dióxido-5,6-dihidro-2 metil-1,4-oxatiin-3 carboxianilida) de forma impírica $C_{12}H_{13}O_4N_5$ apresenta-se na forma de pó molhável, pouco solúvel em água e solúvel em acetona. As concentrações de Plantvax utilizadas foram preparadas após solubilização do fungicida em acetona. A concentração final da acetona, nos tratamentos não excedeu a 1%, valor este já verificado como não inibidor do fungo.

Sobrevivência dos conídios — Através de uma alça de inoculação os conídios de uma cultura com 72 horas de incubação foram transferidos para uma solução esterilizada de Tween 80 (0,1% v/v). Os conídios foram semeados em placas de Petri contendo meio completo acrescido das diferentes concentrações do fungicida. O período de incubação foi de 72 horas à 37°C.

Taxa de crescimento — Para obtenção da taxa de crescimento inocularam-se por picadas os conídios no centro das placas contendo meio completo e as diferentes concentrações do fungicida. A incubação processou-se por três períodos a 37°C.

Resultados e Discussão

Pela exposição dos conídios às diferentes concentrações de Plantvax foi possível construir uma curva de sobrevivência. A Figura 1 e a Tabela 1 mostram curva de sobrevivência, o número de colônias formadas e as porcentagens de sobrevivência e o número de conídios da referida linhagem após exposições de 10, 20, 40, 80, 160, 320, 640, 960, 1.280 e 2.560 $\mu g/ml$ de Plantvax.

Através da medida dos halos de crescimento das colônias da linhagem *pro A 1; paba A 6; y A 1* submetida às diferentes concentrações de Plantvax, pode-se avaliar o desenvolvimento do fungo. As Tabelas 2, 3 e 4 indicam os diâmetros dos halos nos períodos de 72, 96 e 120 horas de incubação e a Figura 2, as curvas das taxas de crescimento, representadas pelos seus valores médios.

As análises da variância dos dados das Tabelas 2, 3 e 4 indicam que as taxas de crescimento da linhagem submetida às diferentes concentrações de Plantvax diferiram significativamente.

Figura 1 — Curva de sobrevivência da linhagem *pro A 1; paba A 6; y A 1* tratada com o fungicida Plantvax

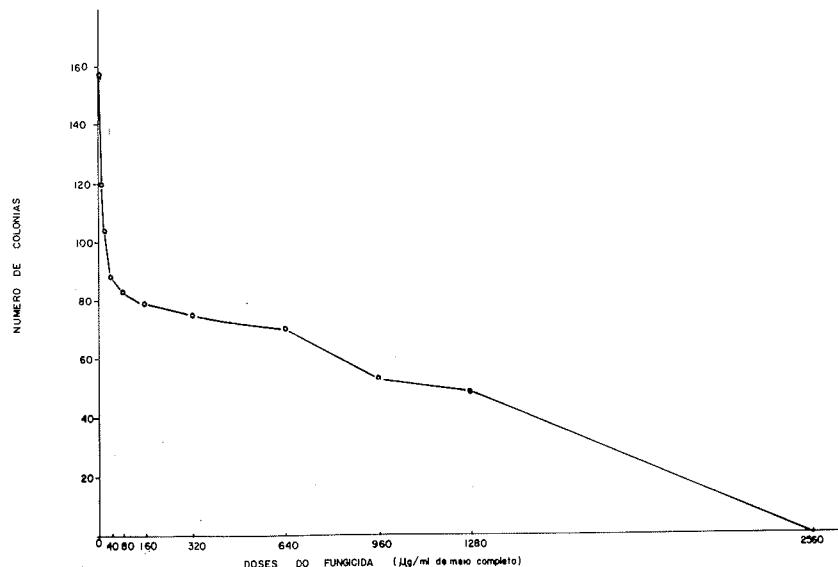


Tabela 1 — Porcentagens de sobreviventes da linhagem *proA1; pabaA6; yA1* tratada com Plantvax

Concentrações ($\mu\text{g/ml}$)	Nº de colônias (médias)	% de sobreviventes	Nº de sobreviventes (conídios/ml)
0	158	100,00	$1,53 \times 10^6$
10	120	75,60	$1,15 \times 10^6$
20	104	65,52	$1,00 \times 10^6$
40	88	55,44	$8,48 \times 10^5$
80	83	52,29	$8,00 \times 10^5$
160	79	49,77	$7,61 \times 10^5$
320	75	47,25	$7,22 \times 10^5$
640	70	44,10	$6,74 \times 10^5$
960	53	33,39	$5,10 \times 10^5$
1280	49	30,87	$4,72 \times 10^5$

Tabela 2 — Diâmetro de halos de crescimento da linhagem *proA1; pabaA6; yA1* submetida a diferentes concentrações do Plantvax após 72 horas de incubação

Concentrações ($\mu\text{g/ml}$)	Diâmetro dos halos (mm)					Médias
0	48	48	49	50	49	48,8
10	46	44	46	45	45	45,2
20	40	38	39	38	39	38,8
40	30	34	32	31	30	31,4
80	26	28	28	27	26	27,0
160	23	24	24	23	24	23,6
320	18	20	18	19	18	18,6
640	12	11	12	11	10	11,2

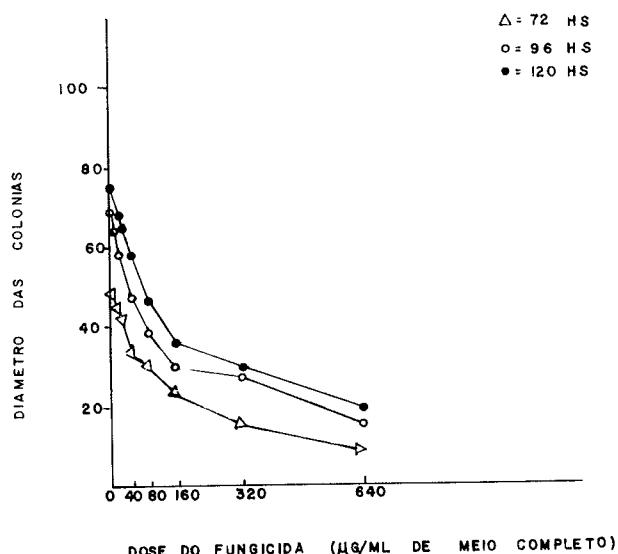
Tabela 3 — Diâmetro dos halos de crescimento da linhagem *proA1; pabaA6; yA1* submetida a diferentes concentrações do Plantvax após 96 horas de incubação

Concentrações ($\mu\text{g/ml}$)	Diâmetro dos halos (mm)					Médias
0	69	68	68	69	67	68,2
10	66	64	64	65	64	64,6
20	60	59	58	58	59	58,8
40	50	50	49	49	51	49,8
80	39	38	39	38	37	38,2
160	30	30	31	31	30	30,4
320	28	26	26	27	28	27,0
640	14	13	15	14	15	14,2

Tabela 4 — Diâmetro dos halos de crescimento da linhagem *proA1; pabaA6; yA1*, quando submetida a diferentes concentrações do Plantvax após 120 horas de incubação

Concentrações ($\mu\text{g/ml}$)	Diâmetro dos halos (mm)					Médias
0	74	74	73	74	75	74,0
10	70	70	71	70	71	70,0
20	67	68	67	67	66	67,0
40	60	59	59	58	59	59,0
80	47	49	48	48	47	47,8
160	35	35	36	34	35	35,0
320	31	30	29	29	30	29,8
640	22	23	22	21	23	22,2

Figura 2 — Curvas das taxas de crescimento, representadas pelos seus valores médios quando da exposição ao Plantvax



te no nível de 1% de probabilidade evidencian- do em efetiva interferência no desenvolvimento do fungo, à medida que as concentrações do fungicida eram aumentadas, relevando assim a ação fungitóxica do produto testado. A curva de sobrevivência evidenciou a total sensibilidade de fungo apenas a partir de 2.560 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de Plantvax indicando a presença de resistentes

espontâneos ao fungicida. A ocorrência de tais fatos pode ser considerada uma alerta para o problema de resistência fúngica, demonstrando a necessidade do conhecimento da sensibilidade do fungo, do emprego de concentrações adequadas e da eventual alternância dos fungicidas usados, como forma de retardamento da ineficácia futura destes defensivos agrícolas.

Referências Bibliográficas

- Edgington, L.V. & Barron, G.L. — Fungitoxic spectrum of oxatiin compounds. *Phytopathology*, 57:1256-1257, 1967.
- Georgopoulos, S.G. & Sisler, H.D. — Gene mutation eliminating antimycin A-tolerant electron transport in *Ustilago maydis*. *J. Bacteriol.*, 103:745-750, 1970.
- Mathre, D.E. — Uptake and binding of oxatiin systemic fungicides by resistant and sensitive fungi. *Phytopathology*, 58:1464-1469, 1968.
- Mathre, D.E. — Mode of action oxatiin systemic fungicides. I — Effect of carboxin and oxycarboxin on the general metabolism of several Basidiomycetes. *Phytopathology*, 60:671-676, 1970.
- Snel, M.B.; Von Schemeling & Edginton, L.V. — Fungitoxicity and structure activity relationships of some oxatiin and triazole derivatives. *Phytopathology*, 60:1164-1169, 1970.
- Van Tuyl, J.M. — Genetics of fungal resistance to systemic fungicides. *Meded. Landbouwhogeschool Wageningen*, 77:65-99, 1977.
- White, G.A. — A potent effect of 1,4 oxatiin systemic fungicides on succinate oxidation by a particulate preparation from *Ustilago maydis*. *Biochem. Biophys. Res. Common*, 44:1212-1219, 1971.

Resistência genética do *Aspergillus nidulans* ao fungicida Benomil

Pedro Magalhães Lacava*

Resumo

Mutante resistente ao fungicida Benomil (Metil 1 (butil-carbamoil)-2-benzimidazole-carbamato) foi obtido espontaneamente, a partir de linhagem de *Aspergillus nidulans*, com freqüência de 3 em 10^6 conídios. A análise genética do mutante (*ben 1*) evidenciou o envolvimento de um gene (*ben 1*), localizado no grupo de ligação VIII. Contudo, não foi observada ligação entre *ribo 2*, usado como marcador genético, e *ben 1*, determinante da resistência ao Benomil.

Summary

Genetical resistance of Aspergillus nidulans to benomil

A resistant mutant to the fungicide Benomil (metil 1 (butil-carbamoil)-2-benzimidazole-carbamato) has been obtained spontaneously from a strain of *Aspergillus-nidulans* at a frequency 3 in to 10^6 conidia. The genetical analysis of *ben 1* mutant has shown the involvement of one gene (*ben 1*) localized in the VIII linkage group, however it was not observed the linkage between *ribo 2* used as a genetical marker and *ben 1* that determines the resistance to benomil.

Introdução

A preocupação com as perspectivas do uso dos fungicidas está se tornando cada vez mais acentuada, dada a maneira progressiva da seleção de linhagem resistentes, das mais variadas espécies de fungo. Constatações de resistências aos derivados do benzimidazol, na prática, são relatadas por Schroeder & Dovas (8), Wuest & col. (18), Wicks (17), Bollen & Van Zaayen (5) e por Talboys & Davis (15). Entre nós, Remiro & Kimati (12), descreveram a ocorrência de *Micosphaerella fragariae*, resistente a Benomil e Tiofanato.

Neste trabalho, são apresentados os resultados da obtenção e análise genética de um mutante de *A. nidulans* resistente ao fungicida Benomil, no qual se procurou caracterizar o gene envolvido na resistência, bem como sua posição no mapa genético do fungo.

Material e Métodos

Linhagens de A. nidulans empregadas — A variante resistente de *A. nidulans* foi obtida a partir de mutante nutricional *pro A 1; paba A 6; y A 1*. Para o cruzamento que permitiu a análise, utilizou-se a linhagem MSE ("Master Strain E"), que possui um marcador genético em cada um dos oito grupos de ligação conforme McCully & Forbes (9).. A origem e descrição dos mutantes podem ser encontradas em Clutterbuck (7).

Meios de cultura — Os meios de cultura empregados para manutenção e ensaios de requisitos nutricionais foram: meio mínimo e meio completo para *Aspergillus* segundo Pontecorvo & col. (11); meio de galactose, preparado do mesmo modo que o meio mínimo, substituindo-se a glicose pela galactose; meio de acetato de

* Departamento de Microbiologia da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias "Campus" de Jaboticabal — UNESP, 14870 Jaboticabal SP.

amônio, conforme Apirion (1) e as soluções suplementares, adicionadas ao meio mínimo, conforme Pontecorvo & col. (11).

Fungicida — Benomil = Metil 1 (butil-carbamoil)-2-benzimidazole-carbamato), tem a seguinte fórmula empírica: $C_{14}H_{18}N_4O_3$. Apresenta-se solúvel em acetona, insolúvel em água, etanol e heptano e caracteriza-se por ser um fungicida sistêmico conforme descrição de Cardoso & col. (6). Para o preparo do Benomil, utilizou-se acetona na concentração final que não excedeu a 1%, valor verificado por Azevedo & col. (4), como não inibidor do fungo.

Obtenção de mutantes resistentes ao Benomil — A obtenção espontânea dos mutantes foi feita através da semeadura de 0,1ml de uma suspensão com $1,53 \times 10^6$ conídios, da linhagem auxotrófica *pro A 1; paba A 6; y A 1*, em placas graduadas, com meio completo contendo o fungicida Benomil, na concentração máxima de $0,500 \mu g/ml$. Após 72 horas de incubação, a $37^\circ C$, as colônias que evidenciaram crescimento, na área de maior concentração do fungicida, foram transferidas para tubos de cultura, contendo meio completo sólido e incubadas normalmente, constituindo-se culturas estoques. Para a caracterização definitiva da resistência, estas culturas foram novamente inoculadas, por picadas em meio sólido completo, acrescido do fungicida, na referida concentração. A freqüência de colônias resistentes foi de 3 em 10^6 conídios. Destas, a que apresentou crescimento normal, sob a ação do fungicida, foi considerada mais resistente e passou a denominar-se *ben 1*. Os níveis de resistência na linhagem original e na MSE foram de no máximo $0,375 \mu g/ml$ do fungicida, ao passo que o *Ben 1* suportou normalmente $0,500 \mu g/ml$ de Benomil.

Técnicas de análise genética — Heterocários — A heterocariose em *A. nidulans* já foi escrita e discutida por Pontecorvo & col. (11). Para obtenção dos heterocários, empregou-se a linhagem MSE, que apresenta diferentes requerimentos nutricionais frente a linhagem *pro A 1; paba A 6; y A 1*. A seguinte técnica foi utilizada: aproximadamente, igual número de conídios, de cada uma das duas linhagens (cerca de 10^6), foi colocado em 2ml de meio mínimo, suplementado com 2% de meio completo. A suspensão contendo os dois tipos de conídios foi incubada por um período de 4 a 5 dias, a $37^\circ C$. Fim o período, formou-se uma película super-

ficial, a qual foi retirada e colocada em pedacos, sobre a superfície do meio mínimo sólido, contido em placa de Petri. Após período de 48 horas, regiões, characteristicamente heterocárticas, puderam ser observadas.

Análise meiótica — O método consistiu no preparo normal do heterocário, em placas de Petri contendo cerca de 40ml de meio mínimo e vedadas por fita celulósica, determinando uma anaerobiose parcial, que favorece a formação dos corpos de frutificação. Após 10 dias de incubação, constatou-se a formação de cleistotécios de vários tamanhos. Através da agulha de inoculação, os cleistotécios maduros e de maior volume foram transferidos para placas com agar a 3%. Na superfície, por intermédio da agulha de inoculação, procurou-se, por rolagem, retirar conídios e células de "Hulle", aderidas. Os cleistotécios limpos foram levados, pela agulha, para todos de ensaio, contendo 0,5ml de solução salina, e comprimidos contra as paredes dos mesmos. Os ascospores libertos foram mantidos em suspensão, a qual teve seu volume completado para 10ml. Desta, alíquotas de 0,1ml foram semeadas em meio completo, o que permitiu verificar se o cleistotécio era ou não híbrido, através dos segregantes.

Classificação dos segregantes — Os segregantes obtidos foram transferidos para placas de Petri, contendo meio completo, em formação de $5 \times 5 + 1$. Após 72 horas de incubação, por intermédio de um replicador multifio descrito por Azevedo & col. (3), transferiu-se as colônias para os meios apropriados, visando a classificação dos segregantes quanto aos requerimentos nutricionais. Os meios empregados foram mínimos, suplementados pelas substâncias exigidas pelas linhagens paternais, exceto um dos requerimentos. A classificação para marcadores visíveis foi efetuada através da observação visual.

A análise através do ciclo parassexual — Os diplóides heterozigotos foram obtidos pelo método descritivo por Roper (13), consistindo em semear, em meio mínimo, conídios que foram previamente ressuspensos em "tween" e originários de um heterocário. Os diplóides prototróficos encontram condições de desenvolvimento em meio mínimo, capacidade esta inexistente nos haplóides, daí a facilidade de isolá-los. A haploidização foi feita com 1,4 -dclor-

2,5 dimetoxil benzeno (Chloroneb). Esta técnica baseou-se no fato do fungicida Chloroneb inibir o crescimento de linhagem diplóides, permitindo o crescimento normal de setores haploides segregantes, sendo de 15 μ g/ml a proporção deste fungicida, adicionada ao meio completo, conforme Azevedo & Pacheco Santana (2).

Resultados e Discussões

A análise genética dos variantes resistentes obtidos: Análise Meiótica — Cruzamento da variante resistente ao Benomil com a linhagem MSE. Após 72 horas de crescimento, em meio completo sólido a 37°C, colônias derivadas de cleistotécios híbridos, oriundos do cruzamento da linhagem MSE com a variante resistente ao fungicida Benomil, foram classificadas quanto a sensibilidade ou resistência a esse fungicida, conforme a Tabela 1.

Tabela 1 — Segregação para resistência em ascosporos do cruzamento de MSE com o resistente ao Benomil

Cruzamento entre resistentes e MSE	Sensíveis	Resistentes	Total	X ²
Ben 1	45	33	78	1,84 ^{NS}

NS — não significativo ao nível de 5% de probabilidade

Análise Mitótica — Os diplóides, obtidos entre a linhagem resistente (*ben 1*) e MSE produziram abundante haploidização, em meio de Chloroneb e puderam ser analisados geneticamente. Os resultados de análise mitótica estão na Tabela 2, indicando que o gene *ben 1* está localizado no grupo de ligação VIII, pois todos os setores sensíveis foram *ribo*⁻ e os setores resistentes *ribo*⁺. Conhecendo-se o grupo de ligação, contendo o mutante resistente, efetuou-se a análise meiótica, na tentativa de mapear meioticamente o determinante *ben 1*. Sendo a linhagem MSE possuidora de pelo menos uma marca genética em cada grupo de ligação, analisaram-se os ascosporos de cleistotécios híbridos, do cruzamento entre MSE e o mutante resistente, a fim de verificar a possível ligação existente entre *ben 1* e a marca da linhagem MSE, localizada no mesmo grupo de ligação. Pelos resultados da análise meiótica (Tabela 3),

Tabela 2 — Análise mitótica: Diplóide MSE, *pro A1; paba A 6; y A 1; ben 1*

Grupo de ligação	Sensíveis	Resistentes
I <i>pro</i> ⁺ <i>paba</i> ⁺	4	4
<i>pro paba</i>	2	3
II <i>w</i> ⁺	2	5
<i>w</i>	4	2
III <i>gal</i> ⁺	1	3
<i>gal</i>	5	4
VI <i>pyro</i> ⁺	2	6
<i>pyro</i>	4	1
V <i>fac A</i> ⁺	3	5
<i>fac A</i>	3	2
VI <i>s</i> ⁺	5	5
<i>s</i>	1	2
VII <i>nic</i> ⁺	1	6
<i>nic</i>	5	1
VIII <i>ribo</i> ⁺	0	7
<i>ribo</i>	6	0

Tabela 3 — Análise meiótica, ligação entre os genes *ben 1* e *ribo 2*, no grupo de ligação VIII

Fenótipo dos segregantes obtidos	Nº de segregantes
<i>ben 1</i> ⁺ <i>ribo</i> ⁺	23
<i>ben 1</i> ⁺ <i>ribo</i> ⁻	18
<i>ben 1</i> <i>ribo</i> ⁺	7
<i>ben 1</i> <i>ribo</i> ⁻	4
	52

c = $\frac{23 + 4}{52} = \frac{27}{52} \cdot 100 = > 50\%$
--

observa-se a não ligação entre a marca *ribo 2*, usada como marcador genético, e *ben 1*, determinante da resistência ao Benomil, em *A. nidulans*.

O X² calculado para a relação 1:1, supondo-se a segregação 1 sensível para 1 resistente, o que ficou comprovado pela não significância do X² ao nível de 5% de probabilidade. Desta forma, a responsabilidade da resistência genética ao fungicida Benomil, em *A. nidulans*, é atribuída a um único gene, denominado *ben 1*.

Tal fato é coincidente com os resultados obtidos por Van Tuyl (16), que isolou mutantes de *A. nidulans* resistentes ao fungicida Benomil, a partir de meio completo contendo o agente inibidor. Pela análise dessas linhagens resistentes, foi verificada mutação nuclear simples; e a resistência ao fungicida, segundo esse autor, foi devida a um gene principal, localizado no grupo de ligação VIII, responsável por um alto nível de resistência ao Benomil. Contudo, dois outros genes ainda poderão determinar a maior resistência a esse fungicida.

Referências Bibliográficas

1. Apirion, D. — A general system for the automatic selection of auxotrophs from prototrophs and vice versa in microorganism. *Nature* (London), 19:959-961, 1962.
2. Azevedo, J.L. & Santana, E.P. — The use of chloroneb to obtain haploid segregants from heterozygous diploids of *Aspergillus nidulans*. *Aspergillus News Letter*, 13:6, 1975.
3. Azevedo, J.L.; Oliveira, A. & Campos, R. — Replicador multifio para transferência de esporos de fungos filamentosos. *Summa Phytopathologica*, 2:237-241, 1976.
4. Azevedo, J.L.; Santana, P.E. & Bonateli, R. — Resistance and mitotic instability to chloroneb and 1,4-oxathiin in *Aspergillus nidulans*. *Mutation Res.*, 48:163-172, 1977.
5. Bollen, G.J. & Zaayen, A.V. — Resistance to benzimidazole fungicides in pathogenic strains of *Verticillium fungicola*. *Neth. J. Pl. Path.*, 81:157-167, 1975.
6. Cardoso, C.O.N.; Cardoso, E.J.B.N.; Toledo, A.C.D.; Kimati, H. & Soave, J. — Guia de fungicidas. *Summa Phytopatologica*, 2:7-8, 1976.
7. Clutterbuck, A.J. — *Aspergillus nidulans*. In: — R.C. King, (ed.) — Handbook of genetics. vol. I. New York, Plenum Press, p. 477-510, 1974.
8. Georgopoulos, S.G. & Dovas, C. — A serious outbreak of strains of *Cercospora beticola* resistant to benzimidazole fungicides in Northern Greece. *Pl. Dis. Repr.*, 57:321-324, 1973.
9. McCully, K.S. & Forbes, E. — The use of p-fluorophenylalanine with "master strains" of *Aspergillus nidulans* for assigning genes to linkage groups. *Genetical Res.* (Cambridge), 6:352-359, 1965.
10. Netzer, D. & Dishon, I. — Effect of mode of application of benomyl on control of *Sclerotiorum* on musk melons. *Pl. Dis. Repr.*, 54:909-912, 1970.
11. Pontecorvo, G.; Roper, J.A.; Hemmons, L.M.; Donald, K.D. & Buffton, A.W.J. — The genetics of *Aspergillus nidulans*. *Adv. Genet.*, 3:142-238, 1953.
12. Remiro, D. & Kimati, H. — Resistência a benomil e tiofato em *Mycosphaerella fragariae* (Tul) Lind. *O Biológico*, 40:22-24, 1974.
13. Roper, J.A. — *Aspergillus*. In: — Chemical mutagens. Vol. II. New York, Plenum Press, 12:343-363, 1971.
14. Schroeder, W.T. & Providenti, R. — Resistance to benomyl in powdery mildew of cucurbits. *Pl. Dis. Repr.*, 53:271-275, 1969.
15. Talboys, P.W. & Davies, M.K. — Benomyl tolerance in *Verticillium dahliae*. *Ann. appl. Biol.*, 82:41-50, 1976.
16. Van Tuyl, J.M. — Genetics of fungal resistance to systemic fungicide. Meded Landbouwhogeschool. Wageningen, 77-82, 1977.
17. Wicks, T. — Tolerance of the apple scab fungus to benzimidazole fungicides. *Pl. Dis. Repr.*, 58:886-889, 1974.
18. Wuest, P.J.; Cole, H. & Sanders, P.L. — Tolerance of *Verticillium malthousei* to benomyl. *Phytopathology*, 64:331-334, 1973.

Sodium chloride tolerance of yeasts isolated from a polluted estuary in Rio de Janeiro

Allen N. Hagler
& Leda Cristina Mendonça-Hagler

Summary

Most of the 121 yeasts representing 51 species had sodium chloride tolerances of 6% to 12% and none were below 4%. Inhibition of growth below the tolerance limit should be an important selective factor in marine conditions since yeasts prevalent in seawater had sodium chloride tolerances of 9% or more and increased lag phases were observed with increased sodium chloride concentration.

Resumo

Tolerância ao cloreto de sódio em leveduras isoladas de água do mar poluída no Rio de Janeiro

A tolerância ao cloreto de sódio foi estudada em 121 estirpes de leveduras isoladas de água de estuário poluído abrangendo 51 espécies. A maioria das leveduras estudadas apresentava tolerância ao cloreto de sódio entre 6 a 12% nenhuma tendo sido inferior a 4%. A inibição do crescimento abaixo do limite de tolerância pode ser um fator seletivo importante em condições marinhas uma vez que as leveduras predominantes em água do mar toleram concentrações iguais ou superiores a 9% de NaCl. Um aumento de fase lag de crescimento foi observado em decorrência das concentrações crescentes de cloreto de sódio.

Introduction

Yeasts are fungi with a predominantly unicellular phase in their life cycles and are often associated with high osmotic pressure environments (9). Most yeasts regardless of the habitat from which they were isolated are able to grow at sodium chloride concentrations equal to the salinity of the sea and commonly grow at double the concentration of seawater (4, 6, 7, 8). An increase in the lag phase with increase in sodium chloride concentration was noted by Phaff & col. (10). Ross & Morris (11) noted a decrease in yield with increased sodium chloride concentration but growth during the 1^{og} phase was not affected. We hoped to see a relation between sodium chloride tolerance and incidence of yeasts in the marine and estuary environments.

Material and Methods

Yeasts were isolated from sites along a polluted estuary and beaches of Rio de Janeiro, Brazil, by spread plate and membrane filter methods on a medium containing 2% glucose, 1% peptone, 0.5% yeast extract, 1.5% agar, 50% seawater, 20mg% chloramphenicol, and pH adjusted to 3.7 with HCl (5). Yeasts isolated were identified according to Lodder (7) and Barnett & Pankhurst (2). *Prototheca zopfii* was identified by the key of Arnold & Ahearn (1) and *Aureobasidium pullulans* by description in Cooke (3).

Sodium chloride tolerance was determined as described by van der Walt (12) in a broth medium containing 2% glucose, 1% peptone, and 0.5% yeast extract with 1% increments of sodium chloride ranging from 0 to 21%. Five ml

* Departamento de Microbiologia Geral, Instituto de Microbiologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Ilha do Fundão 20.000 Rio de Janeiro RJ Brasil

volumes of medium in 16mm tubes were inoculated to a level of about 10^4 cells per ml from a distilled water suspension of cells grown 24hr at 28°C on Sabouraud agar slants. Incubation was at 28°C for 4 days with agitation or 7 days in static culture. Readings were made in a Klett-Summerson clorimeter using a number 66 (red) filter. The lowest sodium chloride concentration at which no visible growth occurred (usually readings of less than 10 klett units) was noted as the sodium chloride tolerance.

Results

All of the 121 strains grew at 3% sodium chloride concentration, which is about the sali-

nity of seawater, but seven strains included in *Candida norvegensis?*, *C. sorbosa*, *Pichia kluyveri*, *Prototheca zopfii*, and *Saccharomyces ce-*

Table 1 — Number of strains and species of yeasts and yeast like organisms with sodium chloride tolerances within ranges of 3% increments

Sodium chloride concentrations in % W/V	number of strains	number of species
< 4	0	0
4 – 6	21	17
7 – 9	35	26
10 – 12	37	27
13 – 15	18	12
16 – 18	5	5
19 – 21	4	4
> 21	1	1

Table 2 — Sodium chloride tolerance of yeasts in glucose, peptone, yeast extract medium with 1% increments of sodium chloride. Laboratório de Ecologia Microbiana e Taxonomia da Universidade Federal do Rio de Janeiro yeast strain numbers are indicated

Species	Strains	Percent tolerance	Species	Strains	Percent tolerance
<i>Aureobasidium pullulans</i>	463	15	<i>Hansenula anomala</i>	242	9
<i>Candida boidinii</i>	157, 212	8		108, 121	10
<i>Candida ciferrii</i>	244	6		510	11
<i>Candida diddensii</i>	131	12	<i>Kloeckera apiculata</i>	454	11
<i>Candida quilliermondii</i>	201	6		490	12
var. <i>quilliermondii</i>	23	8	<i>Metschnikowia?</i> sp.	152	8
	580	10		224	9
<i>Candida humicola</i>	185	7	<i>Pichia kluyveri</i>	337	4
<i>Candida intermedia</i>	322	9	<i>Pichia membranaefaciens</i>	321	6
	84, 236, 245,			554	7
	270, 227	10		542, 594	9
<i>Candida lipolytica</i>	71, 281	12		507	12
	506	13	<i>Pichia ohmeri</i>	481	16
	257	14		376	21
	521, 556, 568			414	21
	584, 587	15	<i>Pichia ohmeri?</i>	420	11
	544	16	<i>Pichia terricola</i>	297, 517	7
<i>Candida lipolytica?</i>	585	8	<i>Prototheca zopfii</i>	2	4
<i>Candida krusei</i>	255	7		316, 328	5
	66, 323	9	<i>Rhodotorula glutinis</i>	194	7
<i>Candida lusitaniae</i>	282	12	<i>Rhodotorula rubra</i>	81, 164, L2F217, L2F218	9
	276	15		238	10
<i>Candida membranaefaciens</i>	110, 111	12		1, 310	13
<i>Candida membranaefaciens?</i>	118	8	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	200	4
<i>Candida mogii</i>	193	10	<i>Saccharomyces exiguis</i>	100	6
<i>Candida norvegensis</i>	140	4		30	8
	137	5	<i>Torulopsis candida</i>	531	11
<i>Candida parapsilosis</i>	62	13		543	15
	150	14		509	19
	312	20	<i>Torulopsis glabrata</i>	317	12
<i>Candida sake</i>	211	8		318	13
<i>Candida shehatae</i>	267	10		39	16
<i>Candida sorbosa</i>	144, 209, 326	4	<i>Torulopsis gropengiesseri?</i>	167	8
	520	9	<i>Torulopsis holmi</i>	498	12
<i>Candida sorboklystos</i>	207, 262	6		418	13
<i>Candida steatolytica?</i>	512, 518	11	<i>Torulopsis maris?</i>	541, 546	11
<i>Candida tropicalis</i>	264	10		344	12
	34	12		93	14
	319, 497	14	<i>Torulopsis</i> sp.	151, 153	10
<i>Candida utilis</i>	251	6		333	16
	320	9	<i>Trichosporon cutaneum</i>	77	6
<i>Candida valida</i>	547	6		29	7
	73	7	<i>Trichosporon penicillatum</i>	24, 260, 513,	9
<i>Candida zeylanoides</i>	46	10		525	
<i>Candida species A</i>	76, 305	8	<i>Trichosporon</i>	183	6
<i>Cryptococcus albidus</i>	40	12	variable?		
<i>Debaromyces hansenii</i>	283	18			
	52	19			

Table 3 — Growth of representative yeasts at different concentrations of sodium chloride expressed as percent of maximum colorimeter reading

Species	% Sodium Chloride															
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
<i>Candida sorbosa</i> 209	100	75	39	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Trichosporon cutaneum</i> 77	90	100	100	90	80	53	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Saccharomyces exiguum</i> 30	100	89	83	69	49	48	33	17	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Candida krusei</i> 66	91	100	99	97	97	93	62	59	34	0	0	0	0	0	0	0
<i>Rhodotorula rubra</i> 238	85	78	100	63	49	48	20	16	9	6	0	0	0	0	0	0
<i>Candida tropicalis</i> 34	94	85	87	96	98	100	87	85	71	68	62	51	0	0	0	0
<i>Debaryomyces hansenii</i> 52	96	91	91	89	91	86	83	82	100	93	67	39	42	21	20	13

revisiae failed to grow at 4%. About two thirds of the strains had sodium chloride tolerances in the 6% to 12% range and only 8% of the strains had tolerances below 6% (Table 1). Sodium chloride tolerances of individual strains of 51 yeasts and yeast like species are noted in table 2. The ranges of tolerances of different strains of the same species were usually narrow but relatively wide ranges were found for *Candida parapsilosis*, *C. sorbosa*, *Pichia membranaefaciens*, *P. ohmeri*, *Rhodotorula rubra* and *Torulopsis candida*. A heavily sporulating strain of *P. membranaefaciens* 507 had higher tolerance than lightly sporulating strains of the same species. Table 3 gives the colorimeter readings at the end of the tolerance tests of some representative yeasts. Generally less growth was noted at higher than at lower sodium chloride levels for the same strain (Table 3), and lag phases were longer at higher salt concentrations.

Discussion

All strains were able to grow at 3% concentration of sodium chloride but some were unable to grow at 4% and could be prevented from growth in marine conditions by their low salt tolerance. *Rhodotorula rubra*, *Debaryomyces hansenii*, *Torulopsis candida*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis*, *Cryptococcus albidus*, and the yeast like species *Aureobasidium pullulans* are all species found prevalent in open ocean studies and had tolerances of 9% or mo-

re. Our strain of *Rhodotorula glutinis* and 2 of 3 strains of *Candida guilliermondii* which are also prevalent yeasts in open ocean, had salt tolerances below 9% but none were below 6%. Since these strains were isolated from a polluted estuary they may not be representative of marine adapted strains. *Candida lipolytica*, *Kloeckera apiculata*, *Torulopsis holmii* and *Hansenula anomala* were isolated from ocean beach sites of Rio de Janeiro (5) all had tolerances of 9% and above. All the above species except *R. glutinis* and *C. albidos* were among the 20 prevalent species in estuary from which the strains of this study were isolated. Additional species prevalent in the estuary with salt tolerances of 9% and above were *Trichosporon penicillium*, *Candida intermedia*, and *Candida brumptii*. Strains of *Candida krusei*, *C. sorbosa*, *C. sorboxylosa*, *Candida sp. A*, *Pichia membranaefaciens*, and *P. terricola* make up a group of species prevalent in the polluted estuary which utilize few of the carbon sources employed in taxonomic tests and had salt tolerances mostly in the 6% to 9% range, lower than prevalent marine yeasts but well above the salinity of sea-water. *Saccharomyces exiguum* and *Trichosporon cutaneum* were among the prevalent yeasts of the polluted estuary and also had salt tolerance in the 6% to 9% range. Of the yeasts prevalent in the estuary from which these strains were isolated only *C. sorbosa* had strains with tolerance below 6%. The increased lag phases and decreased yields of yeasts with increased sodium chloride concentration suggest inhibition of growth at salinity levels well below the

maximum concentration tolerated. Although yeasts are not excluded from growth in marine environments by low salt tolerance, a salt tolerance of 9% and above is characteristic of prevalent marine yeasts and 6% and above of prevalent estuary yeasts. This indicates that high salt tolerance is important in natural selection of yeast in marine environments.

Acknowledgements

This work was supported by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and FINEP grant 527/CT. We thank Heloisa V.G. Catão for her cheerful and efficient technical assistance.

References

1. Arnold, P. & Ahearn, D.G. — The systematics of the genus *Prototheca* with description of a new species *P. filamentosa*. *Mycologia*, 64:265-275, 1972.
2. Barnett, J.A. & Pankhurst, R.J. — A new key to the yeasts. Amsterdam-London, North-Holland Publishing, 1974.
3. Cooke, W.B. — A taxonomic study of the black yeasts. *Mycopathol. Mycol. Appl.*, 27:2-43, 1962.
4. Goto, S.; Yamasato, K.; Okuno, D. & Iizuka, H. — Yeasts from the Pacific ocean. *Proc. IV IFS: Ferment. Technol. Today*, 1972.
5. Hagler, A.N. — Ecologia e taxonomia de leveduras em um estuário poluído e ambientes marinhos do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, Instituto de Microbiologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 1978. 400p. (Tese de Doutoramento).
6. Hoppe, H.G. — Taxonomische untersuchungen an hefen aus der w estlichen Ostsee. Kiel Meeresforsch., 28:219-226, 1972.
7. Lodder, J. — The Yeasts: a taxonomic study. Amsterdam-London, North Holland Publishing, 1970. 1385 p.
8. Norkans, B. — Studies on marine occurring yeasts: growth related to pH, NaCl, concentrations and temperature. *Arch. Microbiol.*, 54:374-392, 1966.
9. Phaff, H.J.; Miller, M.W.; Mrak, E.M. — The life of yeasts. Cambridge, Mass., Harvard University Press, 1966. 186p.
10. Phaff, H.J.; Mrak, E.M. & Williams — Yeasts isolated from shrimp. *Mycologia*, 44:431-451, 1952.
11. Ross, S.S. & Morris, E.O. — Effect of sodium chloride on the growth of certain yeasts of marine origin. *J. Sci. Food. Agric.*, 9:467-475, 1962.
12. Van der Walt, J.P. — Criteria and methods used in classification. In: — The yeasts: a taxonomic study. Amsterdam-London, North Holland Publishing, 1970.

**Filobasidiella neoformans obtido
pelo cruzamento de amostras
de *Cryptococcus neoformans* sorotipo
D com AD***

Lusinete Aciole de Queiroz**
& Adhemar Purchio***

Resumo

Cultura de *Filobasidiella neoformans* Kwon-Chung 1975, obtida a partir do cruzamento das amostras de *Cryptococcus neoformans* sorotipo D (NIH 430) e sorotipo AD (IOC 2520 ex-CBS I32).

Summary

Filobasidiella neoformans obtained from strains of *Cryptococcus neoformans* D and AD serotypes

Culture of *Filobasidiella neoformans* Kwon-Chung, obtained from the conjugation between samples of *Cryptococcus neoformans* serotype D (NIH 430) and serotype AD (IOC 2520 ex-CBS I32).

O estado sexuado de *Cryptococcus neoformans* (Sanfelice) Vuillemin (Lodder, J., ed. The Yeasts. A taxonomic study. 2^a ed. Amsterdam, 1970) foi descrito como *Filobasidiella neoformans* Kwon-Chung (Kwon-Chung, K.J. — A new genus, *Filobasidiella*, the perfect state of *Cryptococcus neoformans*. Mycologia, 67:1197-1200, 1975) e obtido pelo cruzamento das amostras de *C. neoformans* NIH 12 e NIH 430, ambas sorotipo D. Posteriormente, *F. bacillispora* foi obtida com as amostras NIH 191 e NIH 444, com respectivos sorotipos C e B (Kwon-Chung, K.J. — A new species of *Filobasidiella*, the sexual state of *Cryptococcus neoformans* B and C Serotypes. Mycologia, 68:942-946, 1976).

O gênero *Filobasidiella*, criado para acomodar a fase perfeita de *C. neoformans*, é o se-

gundo integrante da família *Filobasidiaceae* Olive (Ustilaginales). É um fungo (levedura) heterótilico, que em agar malte, a 25°C, apresenta as seguintes características (Kwon-Chung, K.J. — Morphogenesis of *Filobasidiella neoformans*. The sexual state of *Cryptococcus neoformans*. Mycologia, 68:821-833, 1976): micélio hialino dicariótico, com gramos de conexão formado depois da conjugação entre duas células compatíveis (opposite mating types); basídio alongado, dilatado no ápice, originado de um ponto lateral ou terminal da hifa dicariótica; a partir de quatro pontos do ápice do basídio, os basidiosporos são produzidos por repetição, em cadeia; a forma dos mesmos varia de oval a elíptica e sub-globosa, com parede delgada e finamente rugosa, medindo de 1,8-2,5mm; o número de basidiosporos varia de 4-20 por cadeia.

* Resultado obtido de vários cruzamentos entre amostras sorotipadas de *C. neoformans*, de diferentes procedências, como parte de uma linha de pesquisas em desenvolvimento na seção de Micologia do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.
 ** Departamento de Micologia da Universidade Federal de Pernambuco, 50.000, Recife, Pe.
 *** Departamento de Microbiologia e Imunologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, 01000, São Paulo, SP.

e, quando germinam, produzem blastosporos, os quais também podem ser originados por brotação da hifa, medindo de 2,5-10,0mm, apresentando cápsula mucóide.

As amostras utilizadas foram: *C. neoformans* NIH 12 sorotipo D, *C. neoformans* NIH 430 sorotipo D e *C. neoformans* IOC 2520 sorotipo AD (ex-CBS I32)***

As amostras de *C. neoformans*, com 72 horas de cultivo em agar malte (Difco) a 25°C, foram misturadas diretamente em placas, contendo agar malte e incubadas a 25°C, segundo o esquema:

NIH 12 (D) × IOC 2520 (AD)

NIH 430 (D) × IOC 2520 (AD)

NIH 12 (D) × NIH 430 (D) — (cruzamento padrão de *F. neoformans*)

Filobasidiella neoformans foi obtida através dos cruzamentos NIH 430 (D) × IOC 2520 (AD) e NIH 12 (D) × NIH 430 (D), o mesmo não ocorrendo com NIH 12 (D) × IOC 2520 (AD).

A literatura disponível sugere ser a primeira vez que se obtém *Filobasidiella neoformans* pelo cruzamento de amostras de *C. neoformans*, sorotipo D com sorotipo AD.

Agradecimentos

À Dra. K.J. Kwon-Chung (envio das culturas NIH 12 e NIH 430); ao Dr. João Salvador Furtado (apoio laboratorial); a Sra. Mary Ester Simões Silva (fotografias).

Figura 1 — Micélio dicariótico, e basídio com esterigma; montagem em água; contraste de fase, X 680



Figura 2 — Micélio dicariótico, grampo de conexão e basídio com basidiosporos; montagem em água; contraste de fase, X 650

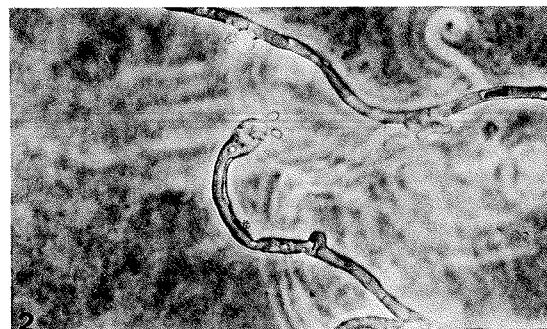
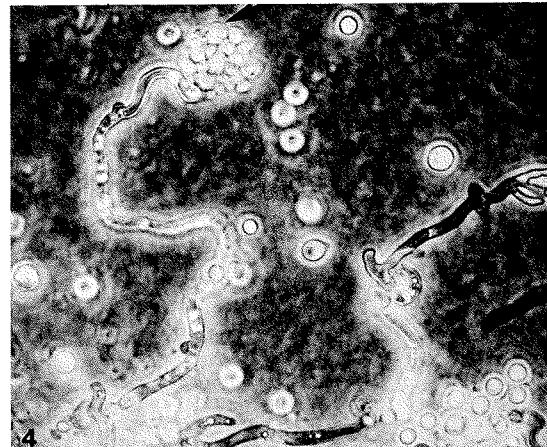


Figura 3 — Micélio dicariótico, grampo de conexão, basídio com basidiosporos; montagem em água; campo claro, X 2.200



Figura 4 — Micélio dicariótico, grampo de conexão, basídio com grande quantidade de basidiosporos (seta) em vista superior inclinada; blastosporos capsulados; montagem em água; contraste de fase, X 700



Yeasts of a polluted Brazilian Estuary

Allen N. Hagler*
Selma S. Santos*
& Leda Cristina Mendonça-Hagler*

Summary

Yeasts were isolated from domestically polluted sea water in Rio de Janeiro Brazil. The most consistently isolated species were *Rhodotorula rubra* and *Candida krusei*. Other species in the genus *Candida*, *Torulopsis*, *Cryptococcus*, *Trichosporon*, *Rhodotorula*, *Kloeckera*, *Hanseniaspora*, *Aureobasidium* and *Prototheca* were also found. Yeast populations up to 172 colony forming units per ml were recorded and runoff from a storm was found to alter the population. Some physiological aspects of the yeasts were discussed as was the possibility of using yeast counts as a pollution indicator.

Resumo

Leveduras de um estuário brasileiro poluído

Leveduras foram isoladas de água do mar poluída com resíduos domésticos no Rio de Janeiro, Brasil. As espécies mais frequentemente isoladas foram *Rhodotorula rubra* e *Candida krusei* enquanto outras espécies dos gêneros *Candida*, *Torulopsis*, *Cryptococcus*, *Trichosporon*, *Rhodotorula*, *Hanseniaspora*, *Aureobasidium* e *Prototheca* foram também encontradas. Foram registradas populações de leveduras de até 172 unidades formadoras de colônias. Alguns aspectos fisiológicos das leveduras foram discutidos bem como a possibilidade do uso das leveduras como indicador de poluição.

Introduction

Yeasts are common in subtropical marine waters, estuaries, and fresh waters, with the most prevalent types being oxidative asporogenous forms with growth requirements for one or more vitamins. The numbers of yeasts in marine environments averaged under 0.1 per ml although counts as high as 5.9 cells per ml were recorded from subsurface samples in the gulf stream. Yeasts were present in higher numbers in less saline waters and the highest yeast densities were found in canals adjacent to sugar cane fields by use of an enrichment technique where levels up to 5.2×10^6 cells per ml of

mostly ascosporogenous and fermentative taxa were recorded (2, 12).

Yeasts in polluted fresh water generally occur in the range of 5 to 270 cells per ml with levels in domestic pollution generally higher than in industrial pollution (14-20). Species found in domestic and industrial pollution were different from each other and from those found in unpolluted waters. Yeasts found in domestic pollution are often species associated with warm blooded animals and man while those from a pulp mill basin were generally associated with trees and soil (7, 18, 19). Most yeasts from polluted waters were unable to use nitrates as a sole source of nitrogen and a relatively large

* Departamento de Microbiologia Geral, Instituto de Microbiologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Ilha do Fundão, 20000 Rio de Janeiro RJ.

proportion was fermentative, especially in domestic pollution (19).

The numbers of yeasts found in raw sewage and sewage disposal systems was high but variable. Cooke (6) reported from 10 to 3.4×10^4 cells per ml while Spencer & col. (18) reported numbers up to 9.8×10^4 cells per ml.

Material and Methods

Two collection sites at the north end of the Island of Fundão in Rio de Janeiro, Brazil, were studied. One site was relatively unpolluted and open to Guanabara bay (site 1) but connected to an adjacent polluted area by a shallow channel. The second site (site 2) was along a narrow channel nearly closed at one end and heavily polluted by domestic waste from a slum which extended over the intertidal area.

Collections were made with sterile 500ml bottles suspended on sterile strings at the surface and about 0.5 meters from the tide line. A modified Sabouraud medium was employed for isolation (peptone 1%, glucose 2%, yeast extract 0.5%, agar 1.2%, seawater 50%, chloramphenicol 20mg%, and pH adjusted to 3.7 with HCl) and plates were incubated at 15°C. Samples were applied to the plates in two ways. Undiluted samples of 0.1, 0.5 and 1.0ml where spread on the surface of the plates or larger volumes were filtered through membrane filters (Millipore HA) which were placed on the

plates. Enrichment cultures were also made using the above medium without agar and the resulting growth was streaked on Sabouraud plates to isolate the yeasts.

Isolates were made of some of the yeasts and yeast like colonies which showed differences in colony morphology. Yeasts were identified according to Lodder (9); *Aureobasidium pullulans* by the description of Cooke (5) and *Prototheca* by the key of Arnold & Ahearn (3). Carbon assimilation tests were carried out using the replica plating technique of Shifrine & col. (13) which employs sterile velveteen fabric mounted on a wooden block. For one set of carbon assimilation tests twenty yeasts were inoculated on each of four master plates and each of these used to inoculate 7 to 8 replications. Tests for the ability to assimilate nitrate nitrogen and ability to grow in vitamin-free medium were carried out in liquid using Wickerham's synthetic media as described in Lodder (9). Specific vitamin requirements were determined by the "subtractive" method of Ahearn & Roth (1).

Salinity was determined by titration of 5ml samples with 0.1N silver nitrate.

Results

Total yeast counts, of "pink yeasts" and the approximate tide at the time of collection are listed in Table 1. The "pink yeasts" probably represented predominantly counts of *Rhodotoru-*

Table 1 — Counts of total yeasts and pink yeasts and approximate tides.

Date	Tide	Total yeasts	Site 1		Site 2	
			pink yeasts		Total yeasts	pink yeasts
Feb. 20	—	25.	2.		6	3.
March 1	—	29.	3.		—	—
March 8	H	19.	1.		—	—
March 11	H	0.3	0.3		—	—
March 15	M	8.	0.3		—	—
March 15	M	1.	0.3		—	—
March 18	H	2.7	0.3		10.	1.
March 25	L	0.5	0.5		—	—
March 28	M	3.	0.5		—	—
April 5	L	3.3	0.1		—	—
April 8	M	1.	1.		—	—
April 15	M	6.	1.		—	—
April 16	H	0.5	0.2		—	—
April 16	M	2.	1.		—	—
April 22	L	0.7	0.2		—	—
April 25	L	1.	0.5		112.	7.
May 8	L	0.1	0.1		82.	6.
May 9	L	0.1	0.1		172.	17.

H = High tide; M = mid tide; L = low tide; — = no data

Counts are in colony forming unites per ml

R. rubra, which comprised all but one of the 25 pink yeasts classified, in spite of considerable variation in color (orange, pink and red) and texture (mucoid to rough) of the colonies. Approximate tides are included in the table because there is indications that they may influence counts (March 15 data). A lowering of the number of yeasts in site one and rise in site two was observed during the study. The proportion of probable *Rhodotorula rubra*, was usually about 10%.

On the night of May 8, 1974 there was a strong rain and hail storm which should be reflected in the collection of May 9. The salinity of the site 2 sample of May 9 was 6.3‰ contrasting with the normal range of 17 to 25‰ at low tide and 28 to 31‰ at high tide. A list of the genera isolated and their proportions of the yeast population on May 8 and 9 are given in

Table 2. The prominent genera before the storm were *Candida* and *Torulopsis* with *Rhodotorula* and *Trichosporon* occurring in lesser numbers but each genus making up more than 10% of the yeast population. These results were-

Table 2 — Genera isolated and their percentages of the yeast population in samples collected on May 8 and May 9, 1974

Date	Genus	%
May 8	<i>Candida</i>	46
	<i>Torulopsis</i>	28
	<i>Trichosporon</i>	13
	<i>Rhodotorula</i>	11
May 9	<i>Kloeckera</i>	81
	<i>Rhodotorula</i>	10
	<i>Candida</i>	5
	<i>Aureobasidium</i>	3

Table 3 — Yeasts isolated and dates of isolations

Taxa	Site 1									Site 2				
	March 1	8	15	28	15	April 16	22	25	May 8	Feb 20	March 18	April 25	May 8	9
<i>Rhodotorula</i>														
<i>R. rubra</i>	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>R. pilimanae</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Cryptococcus albidus</i>														
var. <i>albidus</i>	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-
<i>Torulopsis</i>														
<i>T. candida</i>	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>T. glabrata</i>	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>T. holmii</i>	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
<i>T. maris?</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>T. sp. 18</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Candida</i>														
<i>C. sp.</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>C. brumptii?</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
<i>C. guilliermondii</i>														
var. <i>guilliermondii</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>C. ingens?</i>	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-
<i>C. intermedia</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>C. krusei</i>	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>C. lipolytica</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
<i>C. parapsilosis</i>	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
<i>C. sorbosa</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
<i>C. tropicalis</i>	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-
<i>C. valida</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>C. zeylanoides</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>C. sp. 26</i>	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>C. sp. 28</i>	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>C. sp. 76</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
<i>C. sp. 86</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Trichosporon</i>														
<i>T. cutaneum</i>	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>T. penicillatum</i>	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Sporobolomyces? sp. 88</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Kloeckera apiculata</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>Hanseniaspora uvarum</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
<i>Aureobasidium pullulans</i>	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Prototheقا sp.</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-

re from usual conditions of site 2 without high influence from runoff. Following the storm the yeast population was dominated by *Kloeckera apiculata* and the only other genus forming 10% or more of the yeast population was *Rhodotorula*. The colony counts used in Table 2 did not include colonies obscured by fungal growth and for this reason there is some discrepancy with Table 1 data which included areas under fungal colonies.

A list of the yeasts isolated and dates of isolation is presented in Table 3. Table 4 is a summary from tests of ability to use nitrate as a sole source of nitrogen, ability to grow in the absence of vitamins, and ability to ferment glucose. The most consistently isolated species were *Rhodotorula rubra* which was found in 11 samples and *Candida krusei* which was found in 6 samples. Other species found in more than one collection were *Candida parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. sorbosa*, *Torulopsis holmii*, *Cryptococcus albidus* var. *albidus*, *Trichosporon cutaneum* *Tr. penicillatum* and *Aureobasidium pullulans*.

Table 4 — Tests for fermentation of glucose (fermentation), growth with nitrate as a sole source of nitrogen (NO_3^-), growth in medium lacking vitamins (vitamin free). + = positive growth; - = no growth; \pm = result varied among strains

	Glucose Fermentation	NO_3^-	Vitamin free
<i>Rhodotorula rubra</i>	-	-	\pm
<i>Rhodotorula pilimanae</i>	-	-	-
<i>Cryptococcus albidus</i>	-	+	-
<i>Torulopsis candida</i>	+	-	+
<i>Torulopsis glabrata</i>	+	-	-
<i>Torulopsis holmii</i>	+	-	-
<i>Torulopsis maris</i>	-	-	-
<i>Torulopsis sp. 18</i>	+	-	-
<i>Candida brumptii?</i>	-	-	-
<i>Candida guillermondii</i> var. <i>guillermondii</i>	+	-	-
<i>Candida ingens?</i>	-	-	-
<i>Candida intermedia</i>	+	-	-
<i>Candida krusei</i>	+	-	+
<i>Candida lipolytica</i>	-	-	-
<i>Candida parapsilosis</i>	+	-	+
<i>Candida sorbosa</i>	+	-	\pm
<i>Candida tropicalis</i>	+	-	\pm
<i>Candida valida</i>	-	-	-
<i>Candida zeylanoides</i>	-	-	+
<i>Candida sp. 26</i>	+	+	+
<i>Candida sp. 28</i>	+	-	-
<i>Candida sp. 76</i>	+	-	-
<i>Candida sp. 86</i>	+	-	-
<i>Trichosporon cutaneum</i>	-	-	-
<i>Trichosporon penicillatum</i>	+	-	\pm
<i>Kloeckera apiculata</i>	+	-	-
<i>Hanseniaspora uvarum</i>	+	-	-
<i>Aureobasidium pullulans</i>	-	+	+
<i>Prototheca zopfii</i>	-	-	-

Several isolates of *Candida* species did not comply with the descriptions in Lodder (9) in regard to their vitamin requirements. *Candida sp. 76* differs from *C. sorbosa* in that it assimilated galactose and required biotin for growth. Assimilation of inositol, weak fermentation of glucose and requirement for one or more vitamins excluded *Candida sp. 78* from *C. sorbosa*. Assimilation and fermentation of many carbon sources, ability to use nitrate nitrogen and growth in vitamin free medium were characteristic of *Candida sp. 26*. *Trichosporon penicillatum* was described in Lodder (9) to be able to grow in the absence of vitamins. Our isolates varied in this respect with two negative and one positive strains. In contrast one strain of *Rhodotorula rubra* showed good growth in a vitamin-free medium while several other strains showed weak growth without vitamins. Vitamin independent growth of this species is considered rare (9).

Discussion

The present results agree generally with those of Woollett & Hedrick (19) for domestic pollution although the present work is in a marine subtropical rather than a freshwater temperate environment. In both situations the yeasts were generally unable to use nitrate nitrogen and a large number of the isolates were fermentative. The predominance of asporogenous yeasts and the high number of yeasts requiring one or more vitamins agrees with the findings of Ahearn & col., (2) & Roth & col. (12) in marine and estuary waters at Southern Florida. An agreement was also found for the predominance of *Rhodotorula rubra* among the "pink yeasts" isolated. We also found as was noted by others (19), that there appears to be a complex of strains similar to *Candida krusei* and *C. valida*. Additionally we feel that *C. sorbosa* and the related *C. sp.* (strains 28 and 76) belong to this group.

The presence of *Kloeckera apiculata* and its perfect from *Hanseniaspora uvarum* as a major portion of the populations appears to be unusual. It should be noted that the low numbers of *Kloeckera apiculata* reported by Woollett & Hedrick (19) could reflect their use of a synthetic medium for isolation. These yeasts have high vitamin requirements and our isolates of these species grow poorly on Wickerham's synthetic media which does not appear to provide sufficient vitamins for these strains.

Since colonies are counted rather than cells the actual number of yeasts present may be considerably higher than indicated in results and the actual proportions of the yeasts may also be significantly different from those indicated by colony counts. For example the *Candida* and *Trichosporon* species can form true mycelia and/or pseudomycelia especially in low nutrient conditions such as the corn meal agar commonly used in test for these structures. Mycelial and pseudomycelial formation could then be expected also in aquatic environments as even polluted water is poor in nutrients when compared with most media for yeasts. Therefore the counts of *Candida* and *Trichosporon* would be low compared with the actual number of cells or biomass while species of *Torulopsis* or *Kloeckera* would form roughly one colony per cell since they do not form pseudomycelia. A related problem is the possible formation of microcolonies especially by capsule forming yeasts such as *Rhodotorula* where one colony could represent more than one cell.

The presence of *Kloeckera* and *Hanseniaspora* indicate a high level of vitamins could be present in the polluted estuary water since they have high vitamin requirements (1, 9). With the probable availability of urea as a nitrogen source there would be no selective advantage to being able to use nitrate.

Because of the high level of microrganisms (17, 18) and high amount of oxidizable organic matter in polluted water a low level of oxygen would be expected, especially in deeper water. Additionally a large number of yeasts enter in the water with sewage from the slum near site two. The sewage should contain yeasts of the types isolated from fecal material and warm blooded animals most of which are fermentative (4, 10, 11). Considering the expected low oxygen level and seeding of fermentative species, the high proportion of fermentative yeasts in domestically polluted water is not surprising.

Several yeasts isolated are opportunistic pathogens includidng *Candida tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. quilliermondii*, *C. krusei*, *Torulopsis glabrata* and *Rhodotorula rubra* (8, 9). Their presence in polluted water could be a reservoir

for infection hazards and it should be noted that adjacent waters include a bathing beach (Ramos beach) and a fishing area. It is notable that *C. albicans* was not encountered in this study and this may have been the result of the low incubation temperature used.

Some consideration should be given to the potential of yeasts as pollution indicators especially for high levels of pollution. Yeasts have been found in high numbers in polluted waters of temperate zones of North America and subtropical zones of both North and South America while reports of yeasts from unpolluted waters are consistently low. The most convenient indicator would be *Rhodotorula* because of the ease in spotting the colonies but their proportion of the yeasts population is highly variable ranging from over 50% (14) to less than 10% in the present study. The use of total yeast counts seems reasonable since selective media can virtually eliminate bacteria. Molds which are commonly encountered on the selective media are not difficult to distinguish from yeasts on the basis of colony morphology. Fermentative yeasts could be good indicators of domestic and probably fecal pollution since large proportions of fermentative yeasts (especially *Candida krusei*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* and *C. guilliermondii*) are consistently isolated from domestically polluted waters and these species are frequently isolated from human and animal sources (4, 8, 19). A most-probable-number technique similar to the indicated number technique employed by Cooke (6) but using a selective medium for yeasts and Durham tube to indicate fermentation could prove successful.

Acknowledgements

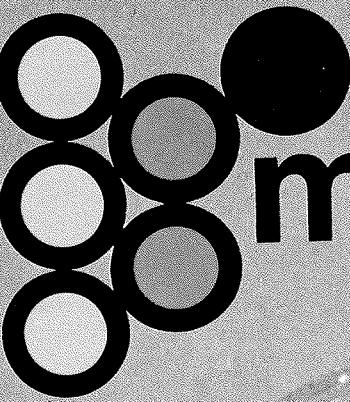
This study was supported in part by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and FINEP grant 527/CT. The technical assistance of Walter Trajano de Lima and typing by Safira da Silva Farache is gratefully acknowledged. We also thank Dr. L.R. Travassos for review of this manuscript.

References

1. Ahearn, D.G. & Roth, F.J., Jr. — Vitamin requirements of marine occurring yeasts. *Dev. Ind. Microbiol.*, 3:163-173, 1962.
2. Ahearn, D.G.; Roth, F.J., Jr. & Meyers, S.P. — Ecology and characterization of yeasts from aquatic regions of South Florida. *Marine Biol.*, 1:291-308, 1968.

3. Arnold, P. & Ahearn, D.G. — The systematics of the genus *Prototheca* with a description of a new species *P. filamentosa*. *Mycologia*, 64:265-275, 1972.
4. Carmo-Souza, L. — Distribution of yeasts in nature. In: Rose and Harrison, ed — *The Yeasts*. Vol. I. London, Academic Press, p. 79-106, 1969.
5. Cooke, W.B. — A taxonomic study of the black yeasts. *Mycopathol. et. Mycol. Appl.*, 27:2-43, 1962.
6. Cooke, W.B. — The enumeration of yeast population in a sewage treatment plant. *Mycologia*, 57:696-703, 1965.
7. Cooke, W.B.; Phaff, H.J.; Miller, M.W.; Shifrine, M. & Knapp, E.P. — Yeasts in polluted water and sewage. *Mycologia*, 52:210-230, 1960.
8. Gentles, J.C. & La Touche, C.J. — Yeasts as human and animal pathogens. In: — Rose and Harrison, ed. — *The Yeasts*. Vol. I. London, Academic Press, p. 107-182, 1969.
9. Lodder, J. — *The Yeasts: a taxonomic study*. Amsterdam, North-Holland Publishing, 1970.
10. Parle, J.N. — Yeasts isolated from the mammalian alimentary tract. *J. Gen. Microbiol.*, 17:363-367, 1957.
11. Phaff, H.J.; Miller, M.W. & Mrak, E.M. — *The life of the yeasts: their nature, activity, ecology and relations to Mankind*. Massachusetts, Harvard University Press, 1966.
12. Roth, F.J. Jr.; Ahearn, D.G.; Fell, J.W.; Meyers, S.P. & Meyer, S.A. — Ecology and taxonomy of yeasts isolated from various marine substrates. *Limn & Oceanograph.*, 7:178-185, 1962.
13. Shifrine, M.; Phaff, H.J. & Demain, A.L. — Determination of carbon patterns of yeasts by replica plating. *J. Bacteriol.*, 68:28-35, 1954.
14. Simard, R.E. & Blackwood, A.C. — Yeasts from the St. Lawrence River. *Can. J. Microbiol.*, 17:197-203, 1971.
15. Simard, R.E. & Blackwood, A.C. — Ecological studies on yeasts in the St. Lawrence River. *Can. J. Microbiol.*, 17:353-357, 1971.
16. Spencer, J.F.T.; Gorin, P.A.J. & Gardner, N.R. — Yeasts isolated from the South Saskatchewan, a polluted river. *Can. J. Microbiol.*, 16:1053-1057, 1970.
17. Spencer, J.F.T.; Gorin, P.A.J. & Gardner, N.R. — Yeasts isolated from some lakes and rivers of Saskatchewan. *Can. J. Microbiol.*, 20:949-954, 1974.
18. Spencer, J.F.T.; Gorin, P.A.J. & Gardner, N.R. — Yeasts occurring in the effluent disposal basins of a pulp mill in Saskatchewan. *Can. J. Microbiol.*, 20:993-998, 1974.
19. Woollett, L.L. & Hendrick, L.R. — Ecology of yeasts in polluted water. *Antonie van Leeuwenhoek*, 36:427-435, 1970.
20. Woollett, L.L.; Hendrick, L.R. & Tarver, M.G. — A statistical evaluation of the ecology of yeasts in polluted water. *Antonie van Leeuwenhoek*, 36:437-444, 1970.





minitek®

Sistema miniaturizado de diferenciação de microorganismos.

O Seu laboratório em miniatura

Em um único sistema compacto, MINITEK® oferece-lhe a diferenciação de microorganismos que é personalizado para manter sua rotina.

MINITEK® oferece-lhe comprovadamente precisão e reproduzibilidade nos resultados para identificação de *Enterobacteriaceae*

Anaerobios

Neisseria

Não Fermentadores de Dextrose

Leveduras

Além de precisão e reproduzibilidade nos resultados, MINITEK® proporciona-lhe, dentre outros os seguintes BENEFÍCIOS:

FÁCIL manuseio

RÁPIDEZ de operação

VALIDADE de 2 a 3 anos

SISTEMA TAXONÔMICO NUMÉRICO

AMPLA variedade de substratos

Tudo isso garantido pela já mundialmente comprovada QUALIDADE BBL.

Para maiores informações ou demonstrações, por favor consulte-nos.

B-D BECTON DICKINSON
INDÚSTRIAS CIRÚRGICAS S.A.

Divisão de Laboratório
R. Said Aiach 302 - Paraiso
São Paulo - SP CEP: 04003
Fones: 549-8133, 71-7170

BBL e Minitek são marcas registradas de Becton, Dickinson and Company.

ODOMIN

DISTRIBUIDORA DE PRODUTOS CIENTÍFICOS LTDA.

São Paulo:

Rua Luiz Góes, 853 — Vila Mariana
Fone: 577-3311

CEP 04043

Porto Alegre:

Rua Dr. Flores, 262 — Conjunto 64
fone: 24-2147

Rio de Janeiro:

Rua 180 — Sala 106



SIGMA

Produtos Bioquímicos

TURNER/ESPECTRA

Fotômetros de chama
Espectrofotômetros
Fluorômetros

TRANSIDYNE

Densitômetros

SHERWOOD

Sistema Monoject,
Aguilhas, Paraplast,
Coagulyzer

THE NUCLEUS

Gamma Counters

HARLECO-S/P

Corantes e aparelhos

S & S

Papel de filtro

BARNSTEAD

Aqua Deionizada Qualidade Reagente.
Ultrapurificada

F.T.S.

Liofilizadores

Câmeras

Ultrafria

NATIONAL

Urinômetros, refractômetros

PRODUTOS QUÍMICOS

MCB, Pfaltz & Bauer, Aldrich, USB, Humko,
Pierce, Calbiochem, ICN, Baker, Eastman,
INLAB, Fluka.

NUCLEPORE

Membranas filtrantes

PROPPER

Lâminas, lâminulas, Pipetas
glób. brancos e vermelhos

CARTER-WALLACE

Kit de toxoplasma e criptococos

HYCEL

Contadores automáticos de células,
Kits superanalizers

DIGIMETRIC

Balanças eletrônicas.

CLAY ADAMS

Contadores de células, Centrífugas

InLAB (Produção própria)

Bacti-Swabs, Uro-Dips, Lancetas,
Capilares, Agulhas, Detergentes

DRUCKER

Centrífugas refrigeradas

OHAUS

Balanças para laboratórios e indústrias

GENERAL DIAGNOSTIC

Soros controle
Tromboplastina cálcica

CULTURETTES

Transporte de amostras
bacteriológicas

B & L (Bausch & Lomb)

Microscopia

OXFORD

Imunodifusão, Pipetadores,
Diluidores, Kits, Cálculo Urisário,
Bicarbonato, Micropipetas.

WELLCOME

Antígenos e antíseros

PFIZER

Antigex-Hepatitis em 4 minutos

GAS PAK

Jarras e componentes

FLOW LABORATORIES

Meios p/ cultura de tecidos, Antígeno
Rubella, Equipamento p/ microtitulação

SWIFT

Microscópios estéreo.
Binocular, Koehler,
de imunofluorescência.

LIVROS TÉCNICOS

Novidades em microbiologia,
imunologia, bioquímica, eletroforese

THERMOLYNE

Agitadores, Mufas, Banhos a seco.

DOLES

Kits bioquímicos

CLINILAB

Centrífugas.

LKB

Gamma e Beta Counters

GILFORD

Espectrofotometria de Precisão.

PHARMACIA FINE CHEMICAL

Produtos para Cromatografia e Separações
Bioquímicas

GELMAN

Eletroforese, Membranas filtrantes

LB (Produção nacional)

Meios de cultura em placa, tubos e frascos,
corantes, reagentes, soluções, padrões.

ASSISTÊNCIA TÉCNICA

Conserto e manutenção de aparelhos para
laboratórios. Peças originais.